

Resumen

La técnica de electrospinning permite conformar matrices de nano/microfibras a partir de disoluciones de polímeros. Estas matrices son llamadas scaffolds o andamios temporales, en particular cuando se conforman desde un polímero biodegradable. Así, los scaffolds tienen como función servir de plataforma para el crecimiento celular y además permiten la liberación controlada de drogas y fármacos.

En este proyecto se forman complejos de β -ciclodextrina (β CD) con la curcumina (CUR), la cual es un compuesto con actividad antitumoral y antibacteriana; posteriormente, estos complejos fueron encapsulados en fibras de ácido poliláctico (PLA). Los complejos β CD/CUR se formaron con diferentes tipos de β CD para proponer un mecanismo de interacción. Las β CD que se han utilizado para la formación de complejos son: β -ciclodextrina (β CD), 2-hiroxipropil- β -ciclodextrina (2-OHPP- β CD), carboximetil- β -ciclodextrina (CM- β CD), metil- β -ciclodextrina (M- β CD) y triacetil- β -ciclodextrina (3A- β CD). Adicionalmente se ha estudiado el compuesto formado con la dextrina lineal (DEX) para hacer una comparación respecto a la cíclica.

Estos complejos han sido caracterizados por Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), microscopía electrónica de transmisión (TEM), diámetros hidrodinámicos (DLS) y carga (potencial-Z).

Después del encapsulamiento de los complejos en las fibras, estas se han caracterizado por su morfología usando técnicas de microscopía óptica (MO), microscopía electrónica de barrido (SEM), y mediante FTIR para el análisis estructural.

La liberación del fármaco ha sido estudiada en función del tiempo y del medio de liberación (buffer fosfato salino o PBS, PBS-FBS y PBS-EtOH, respectivamente) usando espectroscopia UV-Vis. Finalmente, la actividad biológica de la curcumina encapsulada en las nanofibras ha sido estudiada mediante su actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (tales como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente) y mediante la inhibición del crecimiento in-vitro de las líneas celulares tumorales VERO, MCF-7, COS-1, MRC-5, PNT-2 y PC-3.

Por último, se ha efectuado un estudio sobre la sostenibilidad ambiental, el impacto social y económico de este proyecto.

Glosario

BACTERIAS

E.coli: *Eschericcia coli* (bacterias de tipo Gram negativo)

S.aurus: *Staphylococcus aureus* (bacterias de tipo Gram positivo)

CÉLULAS

COS-1: Células de tipo fibroblasto inmortalizado

MCF-7: Células de tipo epitelial

MRC-5: Células de tipo fibroblasto

PC-3: Células de tipo fibroblasto

PNT2: Células de tipo fibroblasto inmortalizado

VERO: Células de tipo epitelial inmortalizado

COMPUESTOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS

β CD: β -ciclodextrina

(2 - OHPP) – β CD: 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina

3A – β CD: Triacetil- β -ciclodextrina

CDCl_3 : Cloroformo deuterado

CM – β CD: Carboximetil- β -ciclodextrina

CUR: Curcumina

DEX: Dextrina

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (medio de crecimiento celular)

DMSO: Dimetil sulfóxido

EtOH: Etanol

FBS: Suero Bovino Fetal

M – β CD: Metil- β -ciclodextrina

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio

PBS: Polibutilenosuccinato (Tampón fosfato salino; pH=7,4)

PLA: Ácido Poliláctico

TÉCNICAS

CA: Ángulo de contacto

DRX: Difracción de Rayos X

FTIR: Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier

MO: Microscopía Óptica

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

SEM: Microscopía Electrónica de Barrido

UV-Vis: Espectroscopia de Ultravioleta-Visible

OTRAS ABREVIATURAS

ρ : Densidad

\varnothing : Diámetro

M/M: Composición en mol/mol

P: Porosidad

PFC: Proyecto Final de Carrera

PM: Peso Molecular

TCPS: Placas de cultivo de poliestireno tratadas para cultivo celular

UCR: Unidad Constitucional Repetitiva

w/w: Composición en peso/peso

v/v: Composición volumen/volumen

%T: Tanto por ciento de Transmitancia

Sumario

RESUMEN	1
GLOSARIO	2
SUMARIO	5
1. PREFACIO	11
1.1. Origen del proyecto	11
1.2. Motivación	11
1.3. Requerimientos previos.....	12
2. INTRODUCCIÓN	13
2.1. Polímeros	13
2.1.1. Generalidades.....	13
2.1.2. Clasificación.....	13
2.1.3. Degradación.....	15
2.2. Polímeros biodegradables.....	16
2.2.1. Clasificación.....	16
2.2.2. Poliésteres alifáticos. PLA.....	18
2.3. Fármaco	22
2.3.1. Curcumina.....	22
2.4. Ciclodextrinas	22
2.4.1. β -ciclodextrinas	24
2.5. Electrospinning (Electrohilado).....	24
2.5.1. Orígenes	24
2.5.2. Electrospinning	24
2.5.3. Montaje	25
2.5.1. Metodología	25
2.5.2. Proceso.....	27
2.5.3. Tipos de electrospinning	29
2.5.4. Aplicaciones.....	30
2.6. Ingeniería de tejidos	32
2.6.1. Scaffolds poliméricos	32
2.6.2. Liberación de fármacos.....	33
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo general del proyecto.....	34
3.2. Objetivos específicos del proyecto	34

3.3. Alcance del proyecto.....	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS	36
4.1. Reactivos	36
4.2. Material de laboratorio	37
4.3. Preparación de las disoluciones a electrohilar.....	37
4.3.1. Preparación de los complejos	37
4.3.2. Preparación de la disolución de PLA	38
4.3.3. Preparación de la disolución de complejos con PLA.....	38
4.4. Electrospinning	39
4.4.1. Equipo de electrospinning horizontal	39
4.4.2. Evaluación de las fibras por microscopia óptica.....	41
4.5. Morfología y diámetro de las fibras.....	41
4.5.1. SEM.....	41
4.6. Ángulos de Contacto (CA)	44
4.7. Espectroscopia de Infrarrojo (IR)	45
4.8. Dynamic Light Scattering (DLS).....	47
4.9. Potencial Z.....	48
4.10. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	49
4.11. Liberación de fármacos.....	50
4.11.1. Modelos de liberación en medios de distinta hidrofobicidad	50
4.11.2. Espectroscopia de ultravioleta (UV)	51
4.12. Ensayos biológicos	52
4.12.1. Ensayo de Inhibición del crecimiento bacteriano	52
4.12.2. Ensayo de citotoxicidad usando líneas celulares	53
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
5.1. Formación de los complejos	56
5.1.1. Preparación de los complejos	56
5.2. Caracterización de los complejos	59
5.2.1. Composición	59
5.2.2. Tamaño de los complejos ciclodextrina/curcumina	63
5.2.3. Carga electrostática de los complejos β -ciclodextrina/curcumina	64
5.3. Optimización de la técnica de electrospinning.....	66
5.3.1. Parámetros operacionales óptimos.....	66
5.4. Caracterización de las matrices.....	68
5.4.1. Diámetro de las fibras mediante SEM.....	68
5.4.2. Ángulos de contacto	72
5.4.3. Análisis de FTIR de las matrices de fibras cargadas.....	74

5.5. Actividad de las matrices.....	76
5.5.1. Liberación de la curcumina encapsulada como complejo en las nanofibras de PLA.....	76
5.5.2. Inhibición del crecimiento bacteriano	77
5.5.3. Biocompatibilidad celular	79
6. CONCLUSIONES	81
7. ESTUDIO DE SOSTENIBILIDAD DEL PROYECTO	82
7.1. Impacto ambiental	82
7.2. Evaluación económica	85
AGRADECIMIENTOS	89
BIBLIOGRAFÍA	91
Referencias bibliográficas.....	91
Bibliografía complementaria	95

1. Prefacio

1.1. Origen del proyecto

La actual preocupación por el medio ambiente ha contribuido a la investigación de los polímeros biodegradables. Recientes investigaciones desvelan que las fibras electrohiladas a partir de polímeros biodegradables tienen numerosas aplicaciones en el campo de la biomedicina concretamente en ingeniería de tejidos y en la liberación de fármacos.

El grupo de investigación “Polímeros Sintéticos: Estructura y Propiedades” (PSEP), que estudia Polímeros biodegradables, del Departamento de Ingeniería Química de la ETSEIB (Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de Barcelona) de la UPC (Universidad Politécnica de Cataluña) tiene una importante trayectoria en la conformación de polímeros biodegradables mediante la técnica del electrospinning.

Diversos PFC realizados en el PSEP en los últimos años han consistido en la preparación de matrices de microfibras o nanofibras como plataformas para el cultivo celular (scaffolds) y como sistemas liberadores de fármacos. Para la formación de estas matrices se han preparado fibras uniaxiales de un polímero o mezclas de dos polímeros con diferentes hidrofobicidades.

Actualmente se ha iniciado la investigación de aplicaciones innovadoras para la técnica de electrospinning. Una de estas aplicaciones consiste en utilizar estas matrices como plataforma de encapsulamiento de fármacos con la finalidad de conservar, transportar y liberarlos de forma controlada.

Encontrar una buena plataforma de encapsulado es uno de los intereses de investigación. La β -ciclodextrina tiene una estructura cíclica idónea para esto, por ello se ha propuesto estudiar el encapsulado de un fármaco con diferentes β -ciclodextrinas.

1.2. Motivación

En el ámbito personal, la motivación principal es la de poder adquirir nuevos conocimientos sobre materiales poliméricos biodegradables ya que actualmente estos son investigados por sus múltiples propiedades y por sus aplicaciones en el campo de la biomedicina.

Con este proyecto también he podido obtener experiencia a nivel experimental, puesto que he aprendido a iniciarme en trabajos de investigación, a manejar equipos de laboratorio y a

interpretar y tratar los datos obtenidos de la experimentación en un laboratorio de biopolímeros.

1.3. Requerimientos previos

Previamente con el objetivo de establecer las mejores metodologías para alcanzar los objetivos propuestos inicialmente se realizó una investigación bibliográfica.

Este proyecto final de carrera se ha realizado en un laboratorio de investigación, así pues se ha adquirido un conocimiento práctico sobre las técnicas y buenas prácticas que se iban a utilizar. Se han utilizado diversos reactivos que han requerido la búsqueda de sus fichas técnicas de seguridad para garantizar un uso correcto y seguro.

2. Introducción

2.1. Polímeros

2.1.1. Generalidades

Un polímero es un material macromolecular constituido por moléculas formadas por unidades constitucionales que se repiten de una manera más o menos ordenada. Las unidades que se repiten a lo largo de una cadena polimérica se conocen como unidades constitucionales repetitivas (UCR), asimismo denominadas residuo.

Los polímeros se obtienen mediante la polimerización, que es un proceso químico de unión de pequeñas moléculas, denominadas monómeros, entre sí ^[1].

Para que se pueda formar un polímero, es necesario que la funcionalidad del monómero sea igual o superior a dos, es decir que tenga dos o más grupos funcionales que puedan reaccionar ^[2].

2.1.2. Clasificación

Los polímeros pueden clasificarse en base a diferentes características (*Figura 1*) ^{[3][4]}, a continuación se definen estas características:

2.1.2.1. Según su forma

- **Polímeros lineales:** se originan cuando el monómero que lo forma tiene dos puntos reactivos o de ataque químico, de modo que el polímero se forma unidireccionalmente, formando cadenas lineales.
- **Polímeros ramificados:** se forman porque el monómero posee tres o más puntos reactivos de ataque químico, de modo que la polimerización ocurre tridimensionalmente, es decir, en las tres direcciones del espacio ^[5].

2.1.2.2. Según el tipo de monómeros

- **Homopolímeros:** son aquellos que están constituidos por una sola clase de monómeros.

- **Copolímeros:** son aquellos constituidos por dos o más clases de monómeros, dispuestos al azar, alternadamente, en bloques o siendo injertados en una cadena principal ^[5].

2.1.2.3. Según sus propiedades físicas

- **Termoestables:** no fluyen, al calentarlos se descomponen químicamente. Este comportamiento se debe a una estructura con muchos entrecruzamientos, que impiden los desplazamientos relativos de las moléculas.
- **Termoplásticos:** fluyen al calentarlos y se vuelven a endurecer al enfriarlos. Su estructura molecular presenta pocos (o ningún) entrecruzamientos.
- **Elastómeros:** plásticos con un comportamiento elástico que pueden ser deformados fácilmente sin que se rompan sus enlaces o modifique su estructura ^[5].

2.1.2.4. Según su mecanismo de formación

- **Polímeros de adición:** la polimerización no implica la liberación de ningún compuesto de baja masa molecular. Esta polimerización se genera cuando un “catalizador” inicia la reacción. Este catalizador separa la unión de doble carbono en los monómeros, luego aquellos monómeros se unen con otros debido a los electrones libres, y así se van uniendo uno tras uno hasta que la reacción termina.
- **Polímeros de condensación:** La reacción de polimerización implica a cada paso la formación de una molécula de baja masa molecular ^[5].

2.1.2.5. Según su origen

- **Polímeros naturales (o biopolímeros):** son aquellos que se encuentran en la naturaleza, formando parte de los seres vivos como la celulosa, el almidón, el caucho, el colágeno o la seda entre otros.
- **Polímeros sintéticos:** son aquellos fabricados en laboratorios o en procesos industriales de producción como el nylon, la baquelita, el PVC o el teflón ^[5].

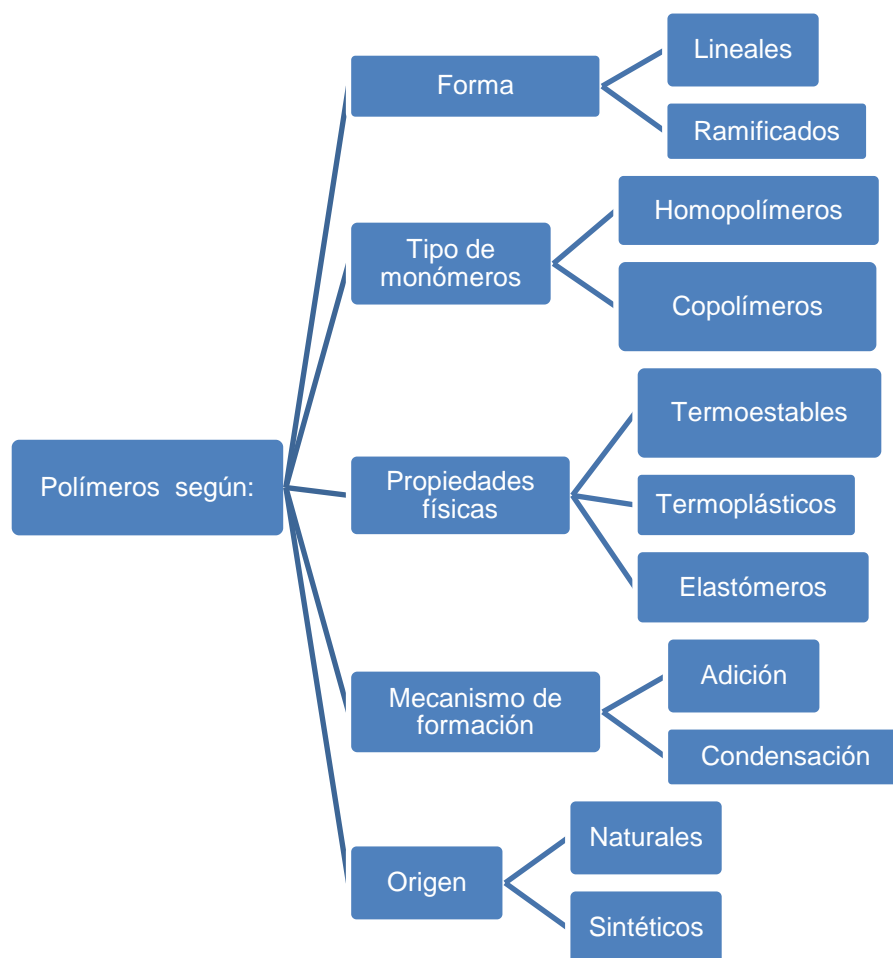


Figura 1. Clasificación de polímeros según sus características

2.1.3. Degradación

El cambio significativo en la estructura química de un polímero bajo unas condiciones medioambientales concretas se denomina degradación. Un polímero puede considerarse degradable si contiene grupos, en la cadena principal, que se pueden romper fácilmente por la acción de agentes externos ya sea de naturaleza física o química. Las reacciones de oxidación o hidrólisis, que generan la degradación, producen cambios en las propiedades en el esqueleto de la molécula y en el grado de polimerización.

El objetivo de la degradación es mantener las propiedades del polímero durante el periodo de utilización para que este sufra un cambio de estructura que lo descomponga en componentes compatibles con el medio ambiente ^[6].

En la degradación de un material polimérico se pueden producir cambios físicos (pérdida de color o brillo, agrietamiento, erosión superficial, disminución de resistencia, alargamiento, etc.) y cambios químicos (rotura de cadenas, cambios en los sustituyentes de cadenas laterales, etc.).

Hay que tener en cuenta que el tipo de degradación depende del agente externo al que ha sido expuesta el polímero y que la velocidad de degradación es mayor cuanto más bajo es el peso molecular del polímero y que a mayor número de grupos funcionales fotosensibles e hidrolizables más efectiva es la degradación medioambiental ^[7].

2.2. Polímeros biodegradables

Los polímeros que se pueden utilizar como fuente de alimentación constituidos por bacterias, hongos, levaduras o enzimas, de manera que su forma original desaparece, se denominan polímeros biodegradables.

Si la biodegradación es total, se asocia a la mineralización completa produciendo agua, sales minerales, biomasa y dióxido de carbono según la naturaleza del medio; Si sólo se produce una alteración de la estructura química y pérdida de propiedades específicas, la biodegradación es parcial ^[8].

La razón del interés en desarrollar este tipo de polímeros biodegradables se debe a que se pueden optimizar las propiedades necesarias de estos para considerarlos biodegradables y al mismo tiempo biocompatibles. Algunas de estas propiedades son que haya compatibilidad con el organismo, que la velocidad de degradación se pueda controlar y que sea capaz de cumplir con la función que se le ha asignado.

2.2.1. Clasificación

Respecto a la naturaleza u origen de los polímeros, podemos decir que existen dos grandes familias, los polímeros de origen sintético, como por ejemplo el ácido poliláctico y los de origen natural, como el colágeno o dextrano ^[9]. En la *Figura 2* podemos ver esta clasificación.

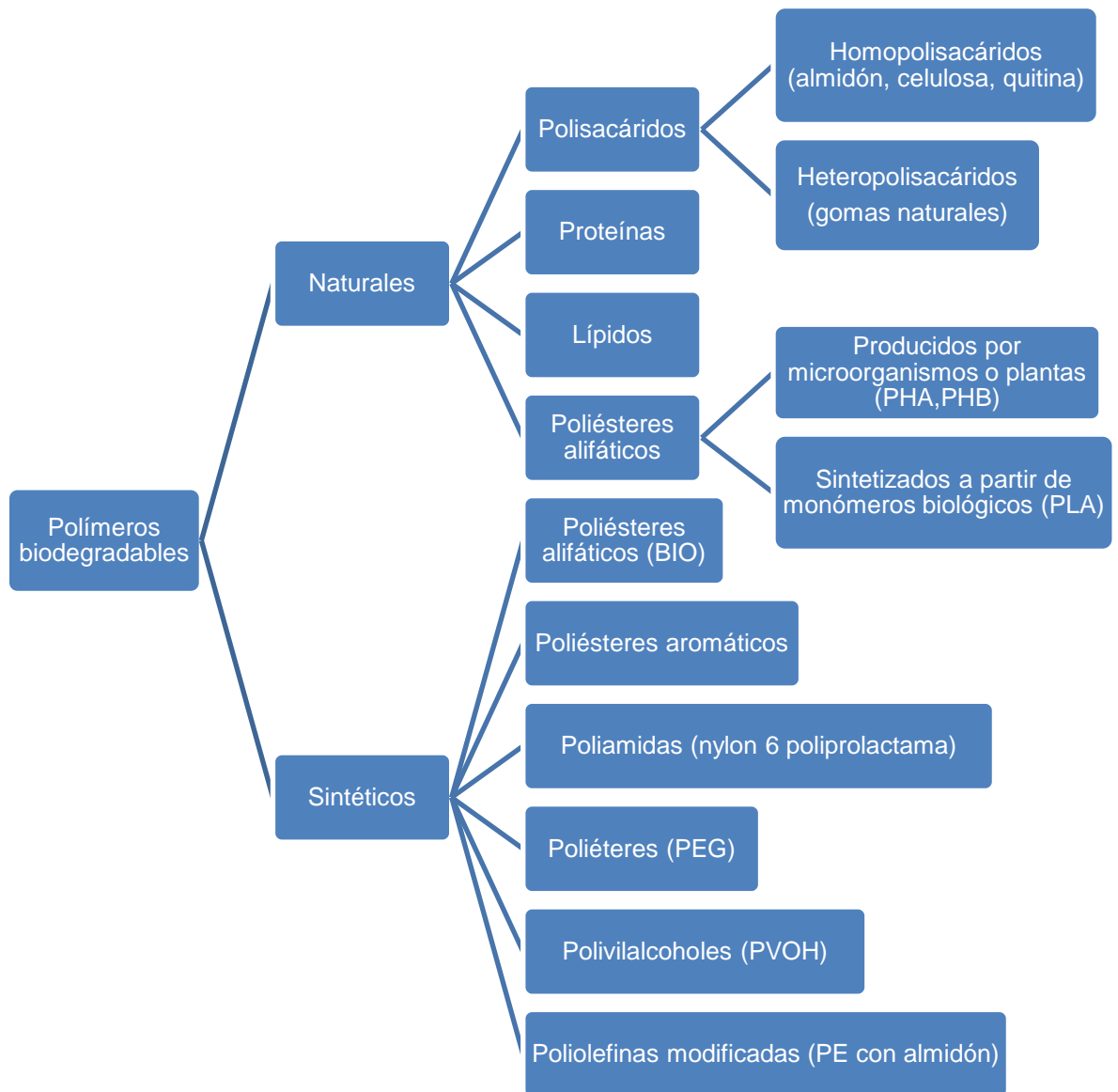


Figura 2. Clasificación de los polímeros biodegradables según su origen. Ejemplos entre paréntesis.

Los polímeros de origen sintético, es decir los creados a partir de fuentes fósiles, se clasifican en seis subgrupos ^{[8][9]}:

- **Poliésteres alifáticos:** PCL
- **Poliésteres aromáticos o mezclas de ambos**
- **Poliamidas:** nylon 6 policaprolactama; nylon 6,6 polihexametilendiamina adipato
- **Poliéteres:** PEG
- **Polivinilalcoholes:** PVOH, PEVOH
- **Poliolefinas modificadas:** PE con almidón

Los polímeros naturales o renovables son aquellos que proceden de recursos de origen natural. Desde un punto de vista químico incluyen cuatro subgrupos:

- **Polisacáridos:** Homopolisacáridos: almidón, celulosa, quitina, etc
Heteropolisacáridos: gomas naturales
- **Proteínas**
- **Lípidos**
- **Poliésteres alifáticos:** Producidos por microorganismos o plantas: PHA, PHB
Sintetizados a partir de monómeros biológicos: PLA

2.2.2. Poliésteres alifáticos. PLA

Los poliésteres se caracterizan por contener enlaces éster (-COO-) en la cadena principal. Las propiedades de los poliésteres son determinadas por la proporción de grupos éster en su estructura y por la geometría, polaridad y movilidad de sus unidades repetitivas (*Figura 3*).

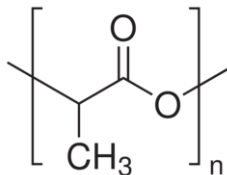


Figura 3. Unidad repetitiva del PLA

La importancia de los poliésteres como biomateriales se debe al enlace tipo éster y su capacidad de degradación hidrolítica (*Figura 4*). Las propiedades de los poliésteres son más sensibles a las variaciones de la estructura en relación a otros polímeros debido a que no hay interacciones moleculares fuertes ^[8].

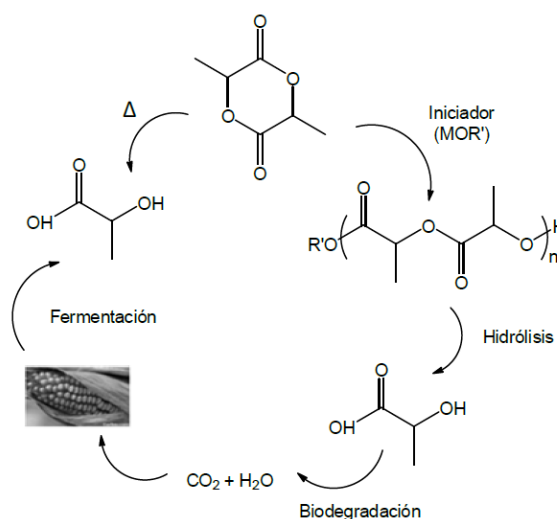


Figura 4. Ciclo de vida del PLA

Los poliésteres lineales alifáticos, según la cantidad de monómeros utilizados para su síntesis, se clasifican en dos grupos ^[9]:

- **Polihidroxiácidos:** Sintetizados mediante la autopolicondensación de hidroxiácidos o mediante polimerización por apertura de anillo de lactonas y lactidas.
- **Polialquilendicarboxilatos:** Sintetizados mediante la policondensación entre dioles y diácidos.

2.2.2.1. Ácido poliláctico (PLA)

El ácido poliláctico (PLA) es un polímero termoplástico, amorfo o semicristalino, que ha sido ampliamente estudiado en aplicaciones como la liberación controlada de fármacos, suturas biodegradables y diferentes implantes para la fijación de fracturas y para la elaboración de dispositivos vasculares ^[10].

El PLA se clasifica dentro de la categoría de biopolímero de origen natural ya que su monómero (ácido láctico) es obtenido mayoritariamente por fermentación. Su clasificación también podría situarse en la categoría de poliésteres sintéticos dado que se puede sintetizar a partir de fuentes fósiles ^[11].

2.2.2.2. Síntesis

La obtención del PLA se puede dar tanto por condensación/esterificación directa del ácido láctico como por polimerización por apertura de anillo de la lactida. La policondensación directa del hidroxiácido produce material de bajo peso molecular. En cambio, si se obtiene por apertura de anillo (*Figura 5*) de su dímero cíclico, la lactida, el material obtenido es de elevado peso molecular y con un punto de fusión algo superior a 170°C ^{[10][11]}.

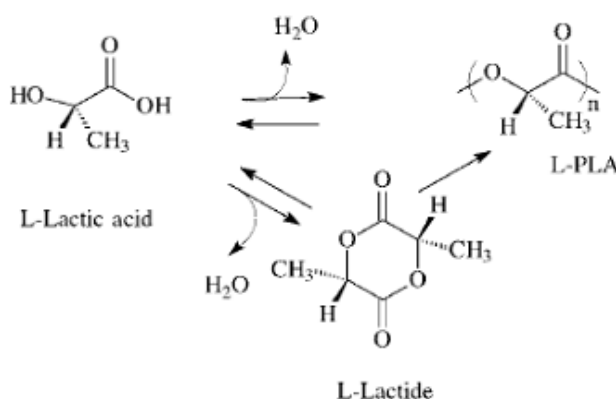


Figura 5. Obtención de PLA por condensación

La condensación directa es una reacción en equilibrio, donde la presencia de trazas de agua en las etapas finales de polimerización del láctido limita su peso molecular. Debido a esta dificultad, la forma mayoritaria de obtener PLA es mediante la reacción de polimerización por apertura de anillo (*Figura 6*). Este proceso combina los beneficios económicos y medioambientales de sintetizar tanto el dímero láctido como el PLA en fase fundida.

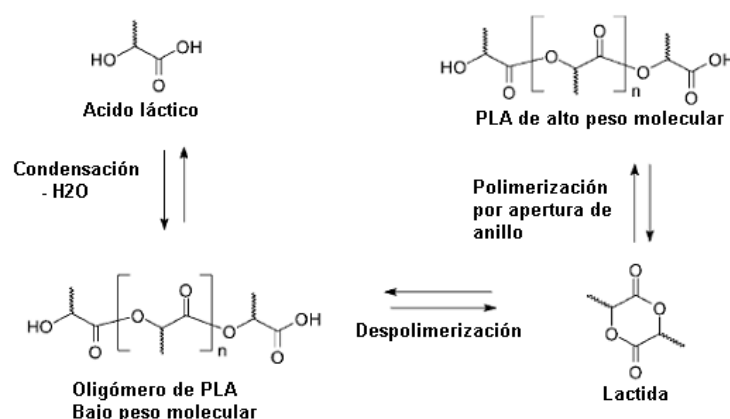


Figura 6. Polimerización de PLA por apertura de anillo

El monómero cíclico tiene dos carbonos asimétricos por lo que es factible preparar polímeros con diferentes tacticidades. La L-lactida es el dímero obtenido a partir del estereoisómero natural, mientras la D, L-lactida está formada por los dos estereoisómeros. El homopolímero derivado del monómero natural, L-láctico (L-PLA), es un polímero semicristalino (grado de cristalinidad del 37 %), debido principalmente a su estereoregularidad. Tiene alta resistencia a la tensión y baja elongación, y consecuentemente tiene un módulo de Young elevado, lo que hace al polímero muy adecuado para aplicaciones que tienen que soportar una carga, como son las suturas y fijaciones ortopédicas. Térmicamente, se caracteriza por tener un punto de fusión elevado (175-178°C) y una temperatura de transición vítrea comprendida entre 60 y 65°C.

El poli (D, L-láctico) (DLPLA) es un polímero amorfo, ya que está formado por los dos isómeros del ácido láctico con una distribución aleatoria, hecho que impide que la estructura sea cristalina. Consecuentemente, este polímero tiene una resistencia a la tensión más baja, alta elongación, y una elevada velocidad de degradación que hace que sea un material muy atractivo para los sistemas de liberación de fármacos. También se preparan copolímeros de

L-PLA y D, L-PLA para disminuir la cristalinidad del polímero quiral y controlar el proceso de degradación ^[11].

2.2.2.3. Biocompatibilidad

El ácido láctico es un intermediario común en el metabolismo de los carbohidratos en las células, el uso de este hidroxiácido es generalmente visto como la situación ideal desde el punto de vista toxicológico, puesto que la acumulación del ácido láctico puede generar una serie de problemas fisiológicos. Los α -poliésteres, como el PLA se degradan inicialmente por hidrólisis y su degradación puede ser acelerada *in-vivo* por la presencia de enzimas, lo cual con lleva a la liberación de su monómero (ácido láctico). Estos monómeros son incorporados dentro de los procesos fisiológicos a nivel celular, donde continúa su degradación entrando en la ruta metabólica de las células (*Figura 7*).

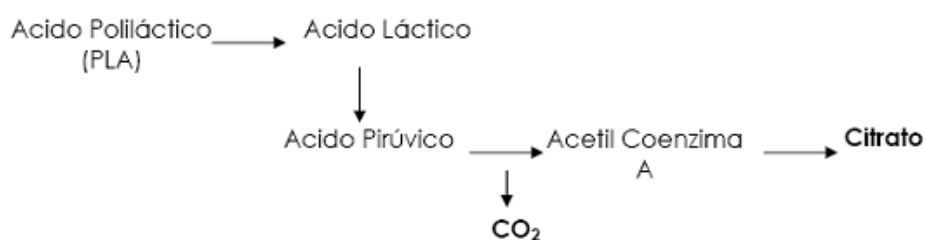


Figura 7. Degradación del ácido poliláctico en el organismo

La ruta metabólica del ácido láctico comienza con la transformación de lactato a piruvato por la acción de la enzima lactato dehidrogenasa; luego, el piruvato sufre una descarboxilación oxidativa para producir acetilcoenzima A. Esta molécula puede entrar en el ciclo del ácido tricarboxílico (o ciclo del ácido cítrico), el cual se realiza en las mitocondrias obteniéndose como resultado por fosforilación oxidativa: ATP más agua y dióxido de carbono, estos dos subproductos son eliminados en la respiración y excretados por los riñones ^[11].

2.3. Fármaco

2.3.1. Curcumina

La curcumina (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona (CUR), cuya fórmula química se muestra en la *Figura 8*, es un derivado fenólico de origen natural de color amarillo anaranjado obtenido a partir del rizoma de cúrcuma (*Curcuma longa* L) ^{[12][13]}.

La CUR es ampliamente conocida por sus propiedades antitumorales, antiinflamatorias, anticoagulantes, antivirales, antibacterianas y antioxidantes. Se requieren concentraciones bajas para que sus efectos antitumorales actúen por vía tópica a partir de fibras electrohiladas. En las células tumorales, la CUR puede inhibir las vías de señalización mediada por un factor de crecimiento, incluyendo los acoplados a quinasas extracelulares reguladas y proteína quinasa C ^{[12][13][14]}.

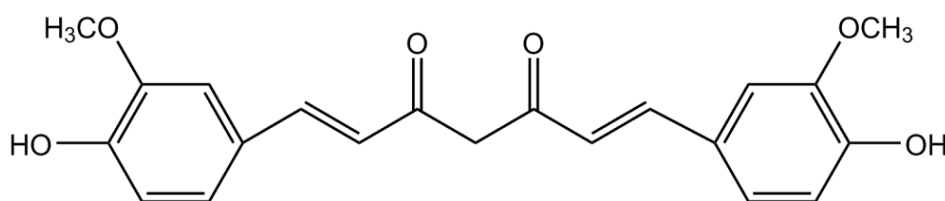


Figura 8. Fórmula química de la CUR

Es inestable en condiciones alcalinas, a los tratamientos térmicos y a la luz. Presenta baja solubilidad en agua pero se puede disolver en disolventes orgánicos como etanol, dimetilsulfóxido (DMSO), acetona o dimetilformamida ^{[12][15]}.

Por todas sus propiedades farmacológicas y físico-químicas es ampliamente utilizada en los cosméticos, la medicina tradicional china y en productos farmacéuticos ^[14].

2.4. Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son moléculas muy simples formadas por diferentes moléculas de glucosa unidas por enlaces α -1-4-glucosídicos. El número de unidades de glucosa determina el nombre de cada ciclodextrina (*Figura 9*), que es designada por una letra griega: α -CD (6 unidades de glucosa), β -CD (7 unidades de glucosa) γ -CD (8 unidades de glucosa), etc. Además, las ciclodextrinas están sujetas a posibles adiciones, sustituciones o eliminaciones que den lugar a modificaciones en su estructura ^{[16][17]}.

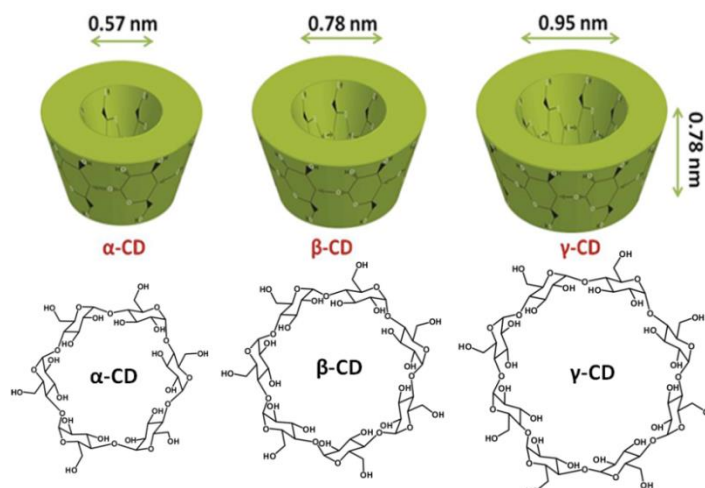


Figura 9. Estructura molecular de diferentes ciclodextrinas

Estas moléculas se caracterizan porque, estructuralmente, tienen forma de anillo cónico con un interior altamente apolar y un exterior muy hidrofílico lo que les otorga una capacidad para encapsular una amplia variedad de moléculas orgánicas e inorgánicas, comúnmente denominadas moléculas huésped, dentro de su cavidad interna (*Figura 10*).

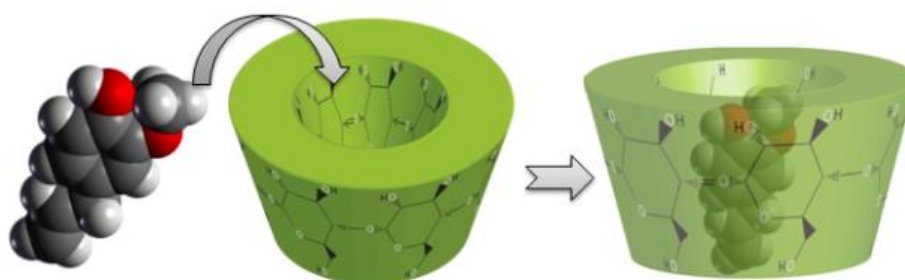


Figura 10. Encapsulación de una molécula en la ciclodextrina

Al no ser cápsulas cerradas, sino que presentan forma de cilindro hueco, las moléculas que quedan atrapadas en su interior son liberadas poco a poco al medio externo. Pues bien, ese fenómeno de liberación controlada está siendo aprovechado por diferentes sectores industriales. Entre ellos destacan la alimentación donde las ciclodextrinas forman parte de alimentos funcionales, la medicina en las que se emplean en el tratamiento de determinadas enfermedades, la farmacología donde las ciclodextrinas se usan en el diseño de nuevos fármacos, la industria textil en las que se usan como blanqueadores de tejidos y también la industria de la cosmética ^{[16][18]}.

2.4.1. β -ciclodextrinas

El principal determinante en cuanto a que la ciclodextrina se utiliza en la formación de complejos es el tamaño de la cavidad. El diámetro de la cavidad de las β -ciclodextrinas o compuestos de unidades de glucopiranosas β se adapta bien para el uso con moléculas del tamaño de hormonas, vitaminas y muchos compuestos que se utilizan con frecuencia en aplicaciones de tejidos y cultivos celulares. Por esta razón, la β -ciclodextrina se utiliza más comúnmente como agente complejante ^[19].

2.5. Electrospinning (Electrohilado)

2.5.1. Orígenes

En 1987 Rayleigh evalúa el efecto de inducir cargas eléctricas en chorros de agua y la estabilidad de éstos. Zeleny estudia en detalle la técnica a través del análisis del comportamiento de las gotas de solución en el extremo de un capilar y de modelar el comportamiento de los fluidos sometidos a fuerzas electroestáticas. En 1902 se reconoce el origen del electrospinning a través de los dispositivos desarrollados por Cooley y Morton, consistentes en pulverizar líquidos mediante cargas eléctricas y en 1934 Formhals patenta y describe el proceso de electrohilado de polímeros ^{[20][21]}.

No obstante, no fue hasta mediados de la década del 90 cuando investigadores profundizaron en la técnica y descubrieron su gran potencial en la producción de nanofibras. Desde entonces la técnica de electrospinning se ha convertido en un proceso más atractivo gracias a la habilidad de obtener nanofibras uniformes y continuas a partir de la transformación de diversos polímeros sintéticos o naturales ^[22].

2.5.2. Electrospinning

La técnica de electrospinning o electrohilado consiste en la producción de nanofibras a partir de la aplicación de un campo electrostático, donde las fuerzas eléctricas aplicadas son superiores a la tensión superficial en la disolución del polímero, entre el sistema de inyección de una disolución de polímero y un colector metálico. Al aplicar cierto voltaje el chorro despedido de la aguja sale en la dirección del campo, el solvente se evapora y el resto de producto se deposita sobre la placa colectora en forma de fibras nanométricas formando un tejido ^{[20][23]}.

2.5.3. Montaje

El montaje (*Figura 11*) consta de un capilar (puede ser una aguja o un cono), una fuente de alto voltaje con dos electrodos, una jeringa a modo de inyector, una bomba infusora y una placa colectora. La técnica puede ser desarrollada de forma horizontal o vertical.

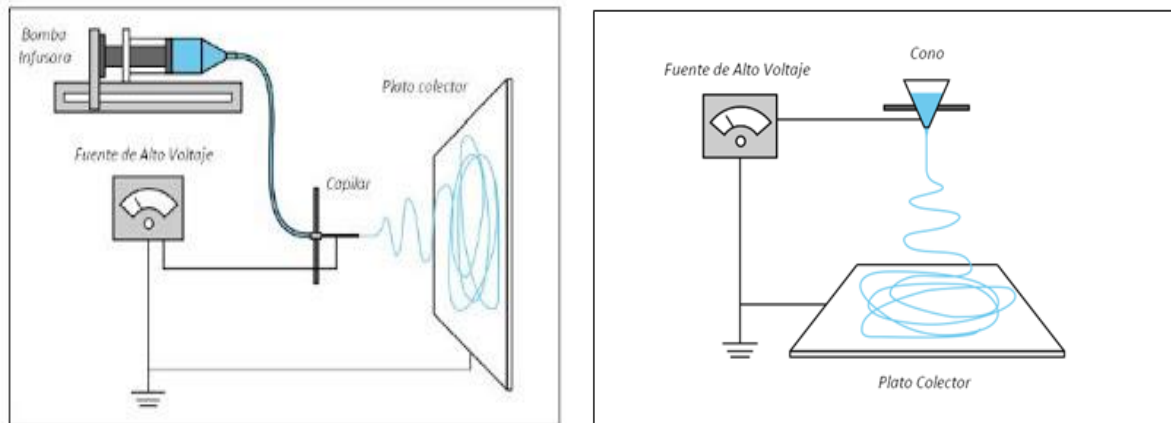


Figura 11. Montaje de electrospinning con aguja y con cono como capilar, respectivamente

2.5.1. Metodología

Previamente se requiere la preparación de la disolución del polímero con el solvente y lo que se quiera contener.

Para el inicio del proceso, el polímero debe estar diluido en el o los disolventes que permitan una dilución completa del mismo (debe ser completa, para evitar taponamiento del capilar durante el proceso) pero que a la vez promuevan la obtención de fibras homogéneas. Los polímeros son dieléctricos, en presencia de un campo eléctrico pueden considerarse como un arreglo de dipolos eléctricos microscópicos compuestos por cargas positivas y negativas cuyos centros no coinciden perfectamente, se mantienen en su lugar por acción de las fuerzas atómicas y moleculares, y solo pueden cambiar su posición ligeramente en respuesta a fuertes campos eléctricos externos, lo que explica por qué ocurre el estiramiento de la solución en el proceso. Son llamadas cargas ligadas en contraposición a cargas libres que determinan la conductividad en otro material conductor ^{[22][24][25]}.

Existen diferentes parámetros (*Tabla 1*) relacionados con las propiedades y características de las fibras obtenidas por electrospinning que se requiere controlar durante el proceso:

- **Concentración de la solución:** Determina el tamaño y forma de las fibras. La concentración de polímero en la solución influye tanto la viscosidad como la tensión superficial de esta, la viscosidad de una solución de polímero está relacionada con el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, si las cadenas son menos entrecruzadas, la solución tendrá una viscosidad baja. El diámetro de las fibras tiende a aumentar con la viscosidad. Si la solución es muy diluida, las fibras de polímero no se forman y caen en gotas antes de llegar al colector debido al efecto de la tensión superficial. Análogamente si la solución está muy concentrada entonces las fibras no se podrán formar debido a la alta viscosidad, dificultando su paso a través del capilar.
- **Tensión superficial:** Intenta reducir el área superficial por unidad de masa, cambiando los chorros por esferas, al aplicar el alto voltaje se busca aumentar la superficie favoreciendo la formación de chorros más delgados, en este caso es la fuerza viscoelástica la que se resiste a cambios rápidos en la forma. El coeficiente de tensión superficial depende del polímero y el disolvente.
- **Conductividad de la solución:** soluciones con alta conductividad tendrán mayor capacidad de transportar las cargas de la solución que aquellas con baja conductividad. La adición de sales a la solución incrementa la conductividad y por consiguiente la fuerza eléctrica para el estiramiento del chorro, lo que promueve una reducción en el diámetro de las fibras.
- **Efecto dieléctrico del disolvente:** el disolvente se encarga de disolver las moléculas de polímero para formar el chorro con carga eléctrica y de llevarlas hasta el colector.

Tabla 1. *Parámetros y propiedades de la solución*

Parámetro		Propiedades y características
Concentración de la solución de polímero	↑	Dificulta el paso de la solución a través del capilar
	↓	Las fibras se rompen en gotas antes de llegar al colector
Tensión superficial	↑	Aparecen defectos en las fibras
	↓	Obtención de fibras lisas
Conductividad de la solución	↑	Mayor transporte de cargas, mayor estiramiento de la solución y obtención de fibras más delgadas.
	↓	Menor transporte de cargas, menor estiramiento de la solución y obtención de fibras más gruesas.

2.5.2. Proceso

Una vez preparada la disolución del polímero con la que se quiere trabajar, se carga la muestra en una jeringa que se conecta a una aguja o mediante un tubo de plástico inerte. Se coloca la jeringa cargada sobre una bomba de perfusión y se une al émbolo de la jeringuilla. Al ejercer presión, se transmite un flujo constante de disolución de polímero a través de la aguja. Se aplica un potencial eléctrico mediante la conexión de un polo a la jeringa y otro a una placa colectora metálica o recubierta de papel de plata conectada a tierra. La separación entre la punta de la aguja y la placa colectora, es decir, la distancia entre electrodos permite la inducción de cargas en el flujo del chorro. La gota que se forma en el extremo del capilar se alarga formando una forma cónica conocida como cono de Taylor. Por las cargas originadas por el campo eléctrico y el efecto de la polarización, la solución se emite en forma de fino chorro hacia la placa colectora. Durante la expulsión del chorro, se va evaporando el solvente y el producto se deposita solidificando en forma de conjunto de fibras no tejidas compuesta de nanofibras con diámetros de micras a nanomicras ^{[20][25]}.

Al igual que con la solución, también se requiere el control de diversos parámetros (*Tabla 2*) en el proceso:

- **Voltaje:** Un voltaje alto suele permitir un mayor estiramiento de la solución debido a la presencia de mayor fuerza de coulomb en el chorro y un fuerte campo eléctrico, promoviendo una reducción en el diámetro de las fibras. La influencia del voltaje depende además de las propiedades viscoelásticas del material base, por ello es importante analizar el comportamiento para cada polímero con su respectivo disolvente.
- **Flujo de salida:** Un flujo de salida menor proporciona más tiempo al disolvente para evaporarse evitando la formación de defectos en las fibras. Cuando el flujo de salida se incrementa, aumenta el diámetro de las fibras y posiblemente en el tamaño de los defectos. El flujo de salida determina la cantidad de solución disponible para el proceso de electrospinning.
- **Distancia:** entre la punta de la aguja y la placa colectora: Dependiendo de las propiedades de la solución el efecto de la variación de la distancia puede o no, tener efecto en la morfología de las fibras. Se requiere una distancia mínima para que el solvente evapore, pero al trabajar con distancias muy grandes las fibras electrohiladas podrían romperse debido a su propio peso, especialmente si las fibras son de diámetro pequeño.
- **Parámetros ambientales:** El aumento de humedad causa la aparición de pequeños poros circulares en la superficie de las. El agua condensada en la superficie de las fibras, al trabajar con alta humedad, puede tener influencia en la morfología de las fibras especialmente cuando se trabaja con disolventes volátiles. Los poros pueden promover una transferencia de proteínas y una migración celular mucho más ágil y fácil en ingeniería de tejidos. La humedad en el ambiente podría determinar la velocidad de evaporación del disolvente en la solución, a humedad relativa baja un disolvente volátil podría evaporarse muy rápido. Por su parte la temperatura puede incrementar la tasa de evaporación y puede ocasionar una reducción en la viscosidad de la solución.

Parámetro		Propiedades y características
Voltaje	↑↑	Fibras gruesas, distorsión del chorro y aparición de defectos
	↓	Poco impulso para la llegada de la solución a la placa colectora
Flujo de salida	↑	Fibras más gruesas y defectos de mayor tamaño.
	↓	Mayor tiempo para evaporación del solvente y fibras sin defectos.
Distancia aguja-colector	↑	Las fibras pueden romperse debido a su propio peso. Mayor estiramiento de la solución y obtención de fibras delgadas
	↑↑ ↓↓	Aparición de defectos en las fibras al trabajar con distancias muy altas o muy bajas
	↓	Poco tiempo para la evaporación del solvente por tanto, las fibras llegan húmedas al plato colector
Humedad relativa	↑	Aparición de poros en las nanofibras

Tabla 2. Parámetros y propiedades del proceso

2.5.3. Tipos de electrospinning

- **Electrospinning coaxial:** El electrospinning coaxial (*Figura 12*) es una modificación o una ampliación de la técnica convencional que permite electrohilar simultáneamente diferentes polímeros dentro de una estructura formada por un núcleo y una corteza de nanofibras. Permite obtener nanofibras con elementos de diferente naturaleza.

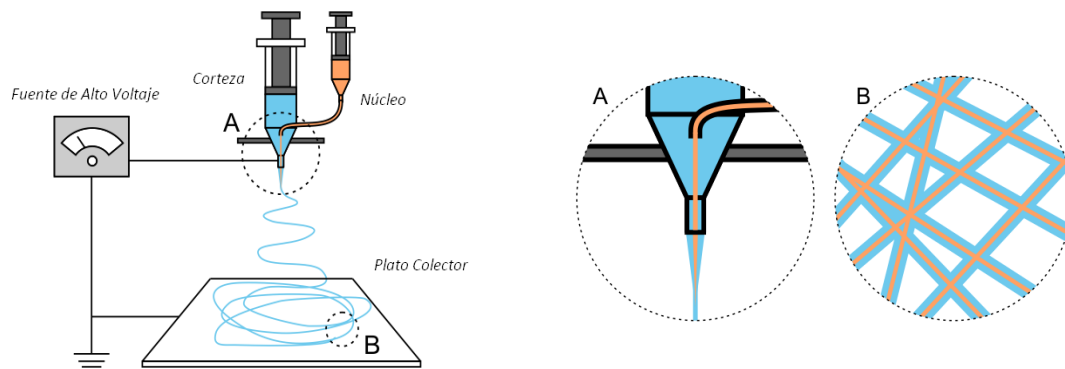


Figura 12. Esquema de montaje y resultado de electrospinning coaxial

- **Electrospinning con camisa de protección:** Una camisa de protección basada en el paso de aire alrededor de la solución polimérica, logra una reducción en el diámetro de las fibras. Permite obtener fibras más finas.
- **Electrospinning con doble componente:** La construcción de sistemas para la ejecución de la técnica conformados por dos ductos y dos capilares permite electrohilar dos materiales en una misma muestra, promoviendo la obtención de elementos con mejores propiedades.
- **Forcespinning:** Se basa en la obtención de micro y nano fibras a través de fuerza centrífuga. Permite eliminar y/o minimizar muchas de las limitaciones que se han encontrado al trabajar con la técnica de electrospinning. La técnica permite procesar una amplia gama de materiales, brinda una tasa de producción mayor, menores costos y un menor efecto nocivo para el medio ambiente al disminuir el uso de disolventes en el proceso ^[20].

2.5.4. Aplicaciones

Hay un creciente abanico de aplicaciones posibles a partir de las fibras obtenidas por electrospinning y se han registrado numerosas patentes, la mayoría relacionadas con filtros y prótesis médicas. Según la morfología de la fibra se utilizan en un campo u otro ^[26]:

- **Aplanadas y cintas:** Sistemas biosensores, debido a la capacidad de transferir electrones y su actividad electroquímica. .

- **Helicoidales:** Nano y microsistemas electromecánicos y electromagnéticos, componentes ópticos avanzados, sistema de liberación de fármacos.
- **Ramificadas:** En el caso de la liberación de fármacos, este comportamiento puede promover la acumulación de medicamento en algunas regiones de la muestra.
- **Huecas:** Nano dispositivos electrónicos y optoelectrónicos, conversión de energía, liberación del fármaco, protección ambiental, sensores entre otros.
- **Con defectos:** Son defectos indeseados dentro del proceso de electrospinning ya que disminuyen la superficie por unidad de área, afectando la homogeneidad de las fibras.
- **Con poros:** Ingeniería de tejidos, catálisis, sensores

A continuación, en la *Figura 13*, podemos observar la gran variedad de aplicaciones que tienen las fibras obtenidas mediante electrospinning ^{[27][28]}.



Figura 13. Aplicaciones potenciales de las micro/nanofibras de polímero

2.6. Ingeniería de tejidos

Actualmente las nanofibras de polímeros se utilizan en suturas, tornillos, cirugía maxilofacial, liberación de fármacos, stents (mallas) para cirugía cardiovascular y clavos para la unión de ligamentos, fijación de fracturas y reparación de meniscos. Una de las aplicaciones más recientes del PLA se encuentra en el campo de la Ingeniería de Tejidos, donde se pretende regenerar tejidos a partir de células del mismo paciente cuyo crecimiento es guiado in-situ mediante andamios (scaffolds) reabsorbibles ^{[29][30]}.

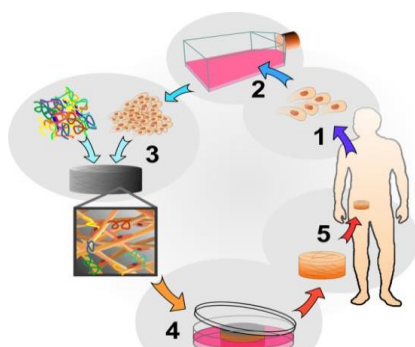
2.6.1. Scaffolds poliméricos

En los andamios temporales o scaffolds encontramos una de las más importantes aplicaciones de los polímeros biodegradables. Los scaffolds son dispositivos de sujeción y soporte cuya función es servir de soporte artificial a un tejido debilitado, ya sea por enfermedad, lesión o cirugía, hasta que haya recuperado su forma, resistencia y funcionamiento característicos ^[31].

Actualmente se utiliza el término scaffold para denominar específicamente a los materiales poliméricos biodegradables de estructura tridimensional y porosa que sirven de soporte para el crecimiento *in vitro* o *in vivo*, con el fin de construir un sustituto biológico para un órgano o tejido que ha perdido su función. Estos andamios temporales se pueden construir a partir de materiales obtenidos mediante la técnica de electrospinning obteniendo micro/nanofibras y notables ventajas. Este ejemplo de aplicación es la base de la ingeniería de tejidos, uno de los campos de la investigación biomédica más interesantes ^{[30][32]}.

En la actualidad se trabaja con la tercera generación de biomateriales. En el diseño de los materiales se busca la interacción con el tejido de forma específica, mediante estímulos a nivel celular y molecular así como la combinación de las propiedades de bioabsorbabilidad y bioactividad dentro del mismo material ^[33].

A continuación se muestra (*Figura 14*) el funcionamiento del desarrollo de scaffolds tridimensionales siguiendo las fases enumeradas a continuación:



1. Extracción de las células del cuerpo
2. Crecimiento de las células *in vitro*
3. Siembra de las células en el scaffold
4. Cultivo para incrementar el número de células
5. Implante del tejido regenerado

Figura 14. Ciclo de desarrollo de scaffolds en ingeniería de tejidos

2.6.2. Liberación de fármacos

La liberación controlada es un proceso eficiente de liberación de medicamentos durante los tratamientos médicos. El objetivo es balancear la cinética de liberación del medicamento, minimizar la toxicidad y los efectos secundarios, todo enfocado a la comodidad del paciente. En general entre más pequeñas sean las dimensiones del fármaco a encapsular y el revestimiento necesario para encapsularlo, mejor será la absorción de este en el organismo. El suministro de fármacos a través de nanofibras de polímero se basa en el incremento de la velocidad de disolución del fármaco debido al incremento de la superficie por unidad de área tanto del fármaco como del vehículo de entrega. La alta superficie por unidad de área y la posibilidad de controlar el perfil de liberación modificando la morfología de las fibras, la porosidad y la composición, convierte a las nanofibras en potenciales vehículos para la entrega de fármacos ^{[34][35]}.

La técnica de electrospinning brinda flexibilidad a la hora de seleccionar los materiales a utilizar, tanto materiales biodegradables como no biodegradables pueden ser usados para controlar la liberación del medicamento sea que esta ocurra solo por difusión o por difusión y degradación del andamio simultáneamente. Las nanofibras para los sistemas de liberación de fármacos provienen principalmente de polímeros biodegradables como ácido poliláctico (PLA), policaprolactona (PCL), ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA), óxido de polietileno (PEO) entre otros ^[35].

3. Objetivos

3.1. Objetivo general del proyecto

El objetivo general del proyecto consiste en el estudio de la formación de complejos β -ciclodextrina/curcumina y su carga en matrices de fibras de PLA obtenidas mediante la técnica de electrospinning. Para cumplir este objetivo, se han formado varios complejos haciendo uso de diferentes tipos de β -ciclodextrina, dada su estructura molecular, para la inclusión y respectiva liberación de fármacos. La selección de la curcumina se debe a sus características como droga antitumoral y propiedades antibacterianas. Los complejos fueron cargados en un soporte formado por fibras de PLA electrohiladas mediante la técnica de electrospinning, estas fibras han de servir como dispositivo de liberación de la curcumina o complejos β -ciclodextrina/curcumina.

3.2. Objetivos específicos del proyecto

Para lograr el objetivo general planteado anteriormente, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudiar la formación de complejos de las diferentes β -ciclodextrina con la curcumina para determinar:
 - a) El tamaño hidrostático del complejo mediante el uso del DLS (Dynamic Light Scattering).
 - b) La carga de los complejos usando el método electroforético del potencial Z.
 - c) La composición de los complejos mediante la caracterización por métodos espectroscópicos de RMN, FTIR, y UV-Vis.
- 2) Determinar los parámetros operacionales óptimos para el electrohilado del PLA y del PLA cargado con los diferentes complejos β -ciclodextrina/curcumina. Para la selección de estos parámetros se realizará la evaluación mediante microscopía óptica de las fibras obtenidas durante el electrospinning.
- 3) Caracterizar morfológicamente las matrices de fibras de PLA cargadas con los complejos de β -ciclodextrina/curcumina. Para ello se estudiará:

- a) La distribución del diámetro de las fibras en las matrices. Este estudio se realizará mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM).
- b) Para establecer la hidrofobicidad de la superficie de las matrices se medirán los ángulos de contacto del agua y del suero fetal bovino (FBS) depositados en las superficies de las matrices de fibras.
- c) Para determinar la composición y características estructurales de las matrices de fibras se realizarán análisis mediante la espectroscopia de radiación infrarroja (FTIR).
- d) Finalmente, se estudiará la liberación de la curcumina desde las matrices de fibras. Para ello, la cuantificación de la curcumina se realizará por espectroscopia UV-Vis.

4) Evaluar la actividad de las matrices:

- a) Determinar la actividad antibacteriana de la curcumina liberada de los complejos β -ciclodextrina/curcumina cargados en las matrices de fibras de PLA. Este estudio antibacteriano se realizará sobre cultivos de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* como bacterias representantes de los grupos Gram-positivas y Gram-negativas, respectivamente.
- b) Determinar la actividad antitumoral de la curcumina desde las matrices de fibras. Esta actividad será evaluada mediante la inhibición de la proliferación celular in-vitro de diferentes líneas celulares.

3.3. Alcance del proyecto

Este PFC abarca diferentes campos de estudio relacionados con los polímeros biodegradables, en concreto el PLA con demanda creciente debido a los problemas medioambientales ocasionados por los residuos globales. Además, el PLA es un poliéster alifático con buenas propiedades.

Por otro lado, el electrospinning de nano o microfibras es un campo en continuo desarrollo. Debido a que la producción de fibras es una de las ciencias con gran salida y beneficio actualmente ya que la producción de estas se puede utilizar para filtros, tejidos protectores, apósitos para heridas, etc.

4. Materiales y métodos

En este apartado se presentan todos los reactivos utilizados, los materiales y los métodos llevados a cabo durante la experimentación, así como la descripción de los equipos utilizados en cada caso.

4.1. Reactivos

Para la realización de los diferentes ensayos de laboratorio se han utilizado los siguientes productos químicos:

- (2 - OHPP) - β CD
- Acetona *Panreac*
- Agua destilada
- Agua desionizada *Millipore*
- Azida sódica (antimicrobiano)
- CM – β CD
- Cloroformo (CHCl_3) *Panreac*
- CUR *Sigma*
- DEX
- DMSO
- *E.coli*
- EtOH absoluto *Panreac*
- FBS
- M – β CD
- MRC - 5
- MTT *Sigma-Aldrich*
- PBS
- PLA amorfo, *Natureworks®*
- *S.aurus*
- 3A – β CD
- β CD
- VERO

4.2. Material de laboratorio

- Agitador tipo Vortex
- Bandejas de pesada
- Báscula de precisión
- Bastoncillos
- Botellas de 1L
- Cubetas de cuarzo y de plástico
- Embudo de filtración
- Embudo Büchner
- Eppendorfs
- Espátula
- Jeringa de plástico de 10 mL
- Material oficina
- Matraces Erlenmeyer y Kitasato
- Micropipetas regulables
- Papel de filtro
- Parafilm
- Pinzas de precisión
- Placa Petri
- Porta y cubreobjetos para OM
- Pipetas Pasteur
- Pera de goma
- TCPS
- Tubos de ensayo de plástico
- Vasos de precipitado
- Viales de 10 mL

Para trabajar con ciertos reactivos se han empleado los siguientes materiales de protección personal:

- Bata de laboratorio
- Guantes de nitrilo
- Gafas homologadas
- Mascarilla

4.3. Preparación de las disoluciones a electrophor

4.3.1. Preparación de los complejos

Los diferentes complejos con los que se ha realizado el estudio se componen de las diferentes β -ciclodextrinas (y dextrina lineal) y curcumina.

1. Se calcula la cantidad en peso, correspondiente a la relación molar elegida CUR - β CD (0,5:1, M/M), de la curcumina y las dextrinas.

$$\text{Para una cantidad de 0,024g CUR} \left\{ \begin{array}{l} 0,1820\text{g (2 - OHPP) - } \beta\text{CD} \\ 0,1708\text{g M - } \beta\text{CD} \\ 0,2010\text{g CM- } \beta\text{CD} \\ 0,2631\text{g 3A- } \beta\text{CD} \\ 0,1480\text{g } \beta\text{CD} \end{array} \right.$$

2. Con ayuda de un papel de pesado se pesa la cantidad de dextrina calculada.
3. Se disuelve la cantidad de dextrina calculada en 5-10 ml de agua.

4. Se pesa la cantidad de curcumina calculada y se añade a la disolución de dextrina con agua.
5. Se deja reposar 24 horas en agitación.
6. Para obtener el complejo en estado sólido, se filtra al vacío la muestra con ayuda de agua destilada.
7. Sobre el embudo poroso se recoge el complejo formado con una espátula y se deposita en un eppendorf. El resto, inservible, se acaba de limpiar con etanol.
8. Los complejos se dejan secar en la estufa 24 horas para eliminar el exceso de agua.

4.3.2. Preparación de la disolución de PLA

La disolución con la que se presentarán los resultados es una disolución de PLA al 8% con CHCl_3 - Acetona (2:1, v/v).

1. Se calcula y se prepara la cantidad de disolvente que se va a utilizar. En este caso para la disolución de CHCl_3 - Acetona se prepara una disolución homogénea con el doble de volumen de CHCl_3 que de Acetona.
2. Se calcula la masa de polímero PLA para realizar la disolución polimérica.
Se pesan 0,8g de PLA para cada disolución a preparar.
3. Se pesa la cantidad calculada con ayuda de una espátula y una bandeja de pesado.
4. Se introduce el PLA pesado en un vial y se añaden 10 ml la mezcla de cloroformo acetona previamente pesada.
5. Se tapa el vial y se sella con parafilm para evitar la evaporación del solvente.
6. Se deja reposar 24 horas en agitación a 37°C.

4.3.3. Preparación de la disolución de complejos con PLA

Para la disolución con la que se llevará a cabo el electrospinning se requiere de la preparación previa de los apartados anteriores.

1. Se calcula la cantidad de complejo adecuada a la proporción de la disolución (en este caso 24 mg corresponden un 3% del total) y se pesa con ayuda de un papel de pesado.
2. Se agita en el vórtex el vial de PLA y se observa la consistencia de la disolución polimérica.
3. Al vial de la disolución se añade el complejo y se vuelve a agitar.



4.4. Electrospinning

4.4.1. Equipo de electrospinning horizontal

El equipo de electrospinning horizontal (*Figura 14*), que se ha utilizado para la obtención de fibras, consta de los siguientes elementos:

- Aguja
- Bomba de desplazamiento
- Fuente de alimentación de alto voltaje
- Jeringa de plástico de 10 mL
- Motor fuente para la rotación
- Rodillo colector
- Superficie colectora

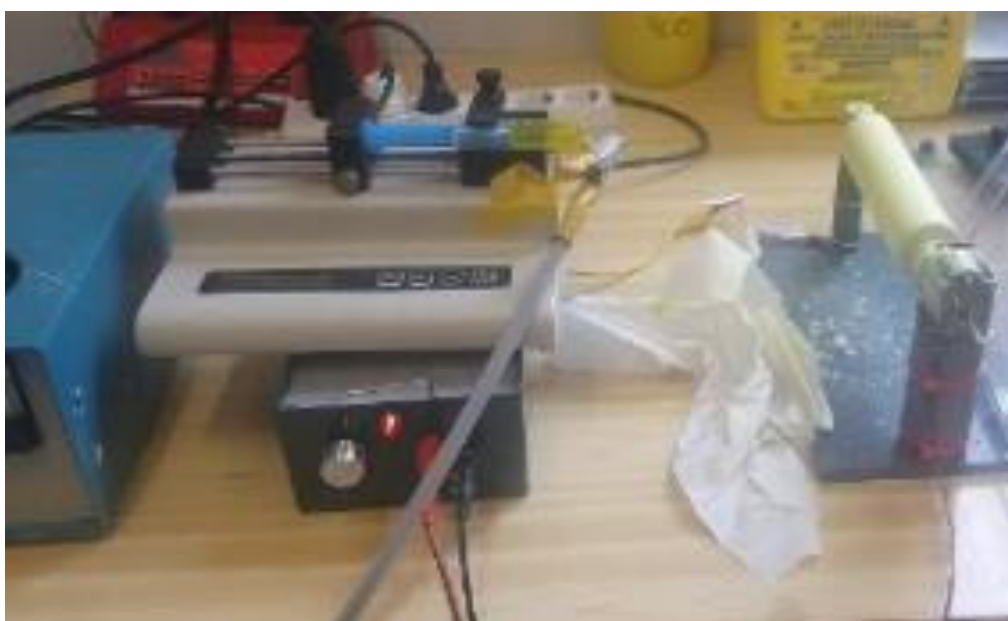


Figura 15. Arriba: Fuente de alimentación, bomba, rodillo colector.
Abajo: Sistema completo en funcionamiento

Se han utilizado además materiales ajenos al equipo de electrospinning como: papel de aluminio, cinta adhesiva, portaobjetos y cubreobjetos.

A continuación se detalla el procedimiento que se ha llevado a cabo para realizar esta técnica:

1. Cargar la jeringa con la solución polimérica evitando burbujas de aire y poner la aguja.
2. Colocarla sobre la bomba impulsora y ajustar la posición fijándola.
3. Elegir en el menú de la bomba el tipo de jeringa, el flujo de trabajo y el volumen de la solución.
4. Cubrir las superficies colectoras (rodillo y placa) con papel de aluminio.
5. Conectar la fuente de alimentación a la superficie colectora y a la aguja.
6. Poner un cubreobjetos sobre la superficie colectora para analizar mediante el microscopio óptico si las fibras obtenidas son válidas.
7. Encender la bomba.
8. Dejar caer la primera gota de solución polimérica, encender la fuente de alimentación en ese instante y regular el voltaje de trabajo.
9. Observar que se forma el cono de Taylor en la punta de la aguja y recoger la muestra en el cubreobjetos.
10. Paralizar el sistema para retirar la muestra y analizarla sobre un portaobjetos en el MO.
11. Si la muestra no es aceptable, repetir el proceso cambiando los parámetros de trabajo. Si la muestra es válida, retirar la superficie colectora y conectar la fuente al rodillo colector en vez de a la placa.
12. Encender el rodillo y establecer un régimen de rotación.
13. Repetir el proceso desde el paso 7 para en este caso recoger todo el volumen de muestra sobre el papel de plata que envuelve el rodillo.
14. Desconectar el equipo una vez finalizado y retirar la muestra del rodillo retirando el papel de aluminio con ayuda de una cuchilla.

4.4.2. Evaluación de las fibras por microscopia óptica

La optimización de las variables de la técnica de electrohilado de las fibras de las matrices obtenidas por electrospinning se ha llevado a cabo mediante microscopia óptica.

El microscopio óptico que se ha utilizado para la valoración y evaluación de las muestras de fibras recogidas en el portaobjetos es el microscopio óptico (MO) *Zeiss Axioskop 40* (*Figura 16*) y se han fotografiado con la cámara digital *Zeiss Axios Cam MRC5* ^[36].



Figura 16. MO Zeiss Axioskop 40

El MO utiliza la luz visible para crear una imagen aumentada del objeto observado. Se compone de dos sistemas de lentes convexas, el ocular y tres objetivos de 5, 20 y 40 aumentos. A través del ocular se obtiene una imagen virtual aumentada de la imagen real ^[37]. Esta imagen permite hacer una valoración previa de la muestra de fibras recogidas de forma rápida y cualitativa.

4.5. Morfología y diámetro de las fibras

4.5.1. SEM

Para el cálculo del diámetro y estudio de la morfología de las fibras se utiliza el microscopio electrónico de barrido (SEM) ya que permite analizar la morfología de la superficie de la fibra a mayor aumento que el MO. El SEM utilizado ha sido el *Focus Ion Beam Zeiss Neon40* (Imagen X) situado en el CRNE (Centre for Research in NanoEngineering).

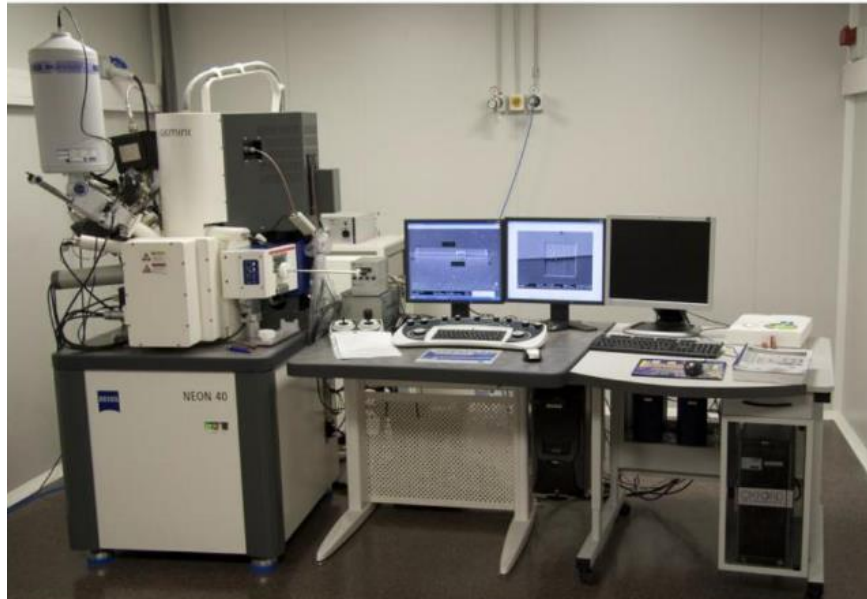


Figura 17. Microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo Zeiss Neon 40

La técnica del SEM se basa en la reproducción de una imagen mediante el uso de electrones. La muestra se introduce en una cámara de vacío, en la parte superior de esta cámara está se ubica el cañón de electrones que genera un haz de electrones que viaja verticalmente a través del microscopio a un voltaje de 5kV generando posteriormente una imagen ^[36]. La muestra es enfocada mediante una serie de lentes electromagnéticas situadas en la columna. Los electrones de alta intensidad inciden sobre la muestra y los electrones dispersados de alta intensidad son captados por detectores que los convierten en una señal digital captada por una pantalla. La muestra debe ser conductora para poder aplicar sobre ella la técnica del SEM. En el caso de que no sea conductora se le debe hacer un tratamiento previo, que consiste en recubrir la muestra con una capa delgada de material conductor (oro o carbono). El recubrimiento, de carbono en este caso, se ha realizado con el dispositivo *Mitec K950 SputterCoater*, el cual crea un recubrimiento por pulverización catódica utilizando un campo eléctrico y gas argón, trabajando en condiciones de vacío.

Los pasos a seguir para analizar una muestra en el SEM son:

1. Si la muestra no es conductora se le realiza un tratamiento previo de recubrimiento de carbono con el dispositivo de recubrimiento. Debido a los destellos producidos por el equipo no mirar directamente sin protección.
2. Una vez recubiertas las muestras, se extraen del equipo y se colocan sobre el cubreobjetos y portaobjetos del SEM.

3. Se introducen en la precámara del SEM con la ayuda de un brazo metálico.
4. Cerrar la precámara y aplicar el vacío.
5. Abrir la compuerta de la precámara y depositar, con la ayuda del brazo, el portaobjetos con las muestras en la plataforma de la cámara.
6. Extraer el brazo y cerrar la compuerta. El interior de la cámara del SEM se puede observar a través del ordenador ya que se reproduce la imagen. Elegir la muestra a analizar con la ayuda del programa informático.
7. Tomar fotografías con el programa Smart Tiff de Carl Zeiss SMT Ltd.

Las imágenes de las fibras fueron obtenidas observando las muestras con un voltaje acelerado de 5 kV. Como se sabe, en la microscopía electrónica la resolución depende de la intensidad del voltaje aplicado sobre la muestra. Esto es una restricción en el caso de la observación de las matrices de fibras de polímeros biodegradables puesto que estos materiales son fundidos con voltajes mayores a 5 kV. Además, las muestras también se funden si la distancia de trabajo disminuye y la magnificación aumenta a pesar de someter la muestra a 5 kV, esto ocurre porque al disminuir el área de exposición la intensidad de electrones por área aumenta y como consecuencia la muestra se funde. Otro problema relacionado a las imágenes SEM de las matrices de fibras es el enfoque. El hecho de que las fibras se distribuyan en diferentes planos ocasiona que, en una imagen de las matrices, no todas las fibras tengan el mismo ajuste en el enfoque, es decir hay planos bien enfocados y otros quedan desenfocados.

Finalmente, las imágenes SEM de las matrices de fibras obtenidas a baja magnificación permiten analizar en su conjunto la distribución y defectos de las fibras, para obtener información sobre las características de la morfología superficial de las fibras se requieren imágenes obtenidas a la mayor magnificación posible, para la medida de los diámetros se requiere de imágenes obtenidas a magnificaciones intermedias que permitan realizar la medida inequívoca de las fibras identificando su distribución para no duplicar las medidas en una misma fibra. Una buena estadística para la distribución de tamaño de las fibras se obtiene con la medida de aproximadamente 100 fibras. La medida de los diámetros se realiza usando el programa *SmartTiff* (Carl Zeiss SMT, Ltd.; Alemania) y se ha de medir en un trazo perpendicular al eje longitudinal de la fibra. Las medidas son tabuladas en una hoja Excel y posteriormente estas medidas son analizadas con el programa *OriginPro v.10* (Origin Microcal, USA) para el procesamiento de los datos.

4.6. Ángulos de Contacto (CA)

La medición de los ángulos de contacto (CA) da información sobre la superficie de la muestra para comprobar si la superficie es hidrofóbica o hidrofílica. El equipo utilizado es el *DataPhysics OCA 15plus* (DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Germany) (*Figura 17*) y el software es el SCA20.



Figura 18. Equipo DataPhysics OCA 15plus para medir CA

El análisis de ángulos de contacto es una técnica superficial y para su medición se emplea el análisis de la forma de la gota aceptando que la gota es una forma simétrica respecto a un eje vertical y teniendo en cuenta que las únicas fuerzas que afectan a la forma de la gota son la tensión superficial y la gravedad. Los ángulos se miden ajustando una expresión matemática a la forma de la gota, calculando el ángulo entre la recta tangente de la gota y la base de referencia. Si el solvente que se utiliza para realizar la medida es acuoso, en general se puede indicar que ángulos superiores a 90° indican que la superficie es hidrofóbica, y ángulos inferiores a 90° corresponden a superficies hidrofílicas ^[38].

Experimentalmente se realiza el siguiente procedimiento:

1. Preparar la jeringa de vidrio con el solvente (agua y FBS en este PFC) para realizar las mediciones, en este caso el agua o suero y colocarla en el equipo para que pueda dispensarla.
2. Introducir en el programa los datos relativos al fluido utilizado, al volumen de la gota y a la manera de dispensarla.
3. Colocar la muestra sobre una superficie metálica y fijarla para que quede plana, colocar la superficie en la base del equipo.
4. Con la ayuda de la cámara observar por la pantalla la muestra y la jeringa. Dispensar una gota.

5. Observando por la pantalla subir la superficie metálica hasta que se toque con la gota y después separarla de manera que la gota quede sostenida encima de la muestra.
6. Con la ayuda del programa aplicar la línea base y medir el ángulo

4.7. Espectroscopia de Infrarrojo (IR)

El análisis mediante espectroscopia de infrarrojo (IR) permite realizar un estudio cualitativo de la muestra determinando los grupos funcionales que la constituyen. El equipo utilizado para realizar este análisis es el *FTIR 4100 Jasco* (Figura 18) con los accesorios *Specacmodel MKII Golden Gate Heated Single Reflection Diamond ATR* y con *ZnS lenses + High Stability Temperature Controller (West 6100+)*



Figura 19. Equipo FTIR 4100 Jasco que opera en modo ATR (reflexión total atenuada).

La técnica del IR se basa en la absorción de radiación infrarroja a una determinada longitud de onda a partir de la excitación de los modos de vibración y subestados de rotación de las moléculas que provocan un cambio en su momento dipolar. Es posible asignar absorciones a grupos funcionales específicos y obtener un espectro de IR diferente para cada molécula ^[39].

El espectro de IR obtenido está compuesto por dos zonas: una con longitudes de onda del infrarrojo medio (entre 4000-1300 cm^{-1}), las bandas observadas están provocadas por las vibraciones derivadas de grupos que contienen H_2 o grupos con dobles o triples enlaces, y otra con longitudes del infrarrojo lejano (entre 1300-400 cm^{-1}), donde las bandas observadas son debidas a absorciones individuales provocadas por las vibraciones moleculares. Para realizar el espectro de las muestras se sigue la siguiente metodología:

1. Encender el espectrofotómetro y el ordenador siguiendo las instrucciones del aparato.
2. Abrir el ATR (a) como se indica en las instrucciones. Limpiar con etanol el soporte de diamante y el cristal de zafiro. Secar para que el etanol se evapore y no haya interferencias.
3. Hacer una línea base (background).
4. Poner la muestra entre el soporte y el cristal. Cerrar el ATR y utilizando el programa informático Spectrameasurement obtener las mediciones del espectro. Guardar el espectro.
5. Para cada muestra repetir el procedimiento a partir del punto 2 (el punto 3 no es necesario repetirlo si la línea base obtenida es correcta).
6. Cerrar el equipo siguiendo las instrucciones.

4.8. Dynamic Light Scattering (DLS)

Para calcular el tamaño hidrostático de los complejos usaremos la técnica de dispersión de luz dinámica, o en inglés, Dynamic Light Scattering (DLS).

El DLS es una técnica que puede usarse para determinar el tamaño del perfil de distribución de pequeñas partículas en suspensión o polímeros en solución, que ofrece algunas ventajas respecto a: velocidad, versatilidad, tamaño de muestras pequeñas, no es destructivo y permite realizar medidas de tiempo independientemente de la densidad de la partícula. Si las partículas no se dispersan en tamaño, se puede calcular el diámetro efectivo medio [40].

El equipo de NanoBrook 90 Plus Zeta de Brookhaven (Figura 20) funciona de forma que hay un detector de luz fijado en un ángulo determinado respecto a la dirección de incisión del haz de luz y fijado a cierta distancia del volumen dispersado que contiene un gran número de partículas. La luz dispersada de cada partícula alcanza el detector. Las partículas se mueven aleatoriamente en líquido de forma que la distancia de la onda hacia el detector varía en función del tiempo. Las partículas pequeñas se mueven más rápido debido al rápido decaimiento de las fluctuaciones respecto a las partículas grandes que se mueven lentamente. Estas fluctuaciones normalmente se analizan para determinar la intensidad o la función autocorrelativa de los fotones (También conocida como correlación fotónica espectral o quasi-elastic light scattering QELS) [41]. Si el sistema es monodisperso, sólo debe haber una población, mientras que un sistema polidisperso mostraría múltiples poblaciones de partículas [42].

El procedimiento para realizar las lecturas es el siguiente:

- 1) Encender el equipo de análisis y el ordenador. Abrir el software BIC Particle Solutions v.3.0.
- 2) Seleccionar el tipo de análisis que se quiere realizar. En este caso QELS.
- 3) Introducir los datos de las muestras a ensayar que nos pide el programa.
- 4) Insertar una cubeta 4 mL de agua para hacer una muestra de referencia. Tomar una medida.
- 5) Añadir el complejo a estudiar disuelto previamente en agua (o suero) a la cubeta y tomar medida.

- 6) Repetir para todos los complejos
- 7) El programa emite los resultados de diámetro efectivo y polidispersidad de las partículas de cada muestra.



Figura 20. Analizador de tamaño de partícula y potencial Z NanoBrook 90 Plus Zeta: Brookhaven

4.9. Potencial Z

El método electroforético del potencial Z (Figura 20) permite calcular la carga de los complejos. El potencial Zeta es el potencial eléctrico que existe en el plano de corte de la partícula, con una distancia corta de la superficie. Las partículas coloidales dispersas en una solución están cargadas eléctricamente gracias a sus características iónica y características de bipolaridad. El desarrollo de una red de carga eléctrica en la superficie de la partícula puede afectar la distribución de iones en una región interfacial vecina y provocar un aumento de la concentración de iones contrarios (iones de carga contraria a las partículas) cerca de la superficie. Cada partícula dispersa en una solución se rodea de iones cargados con carga opuesta que se denomina capa fija. Fuera de esta capa fija, existen distintas composiciones de iones de polaridad opuesta, formando un área nebulosa. De esta manera se crea una capa doble eléctrica en la región de interfase partícula-líquido. La capa doble consiste en dos partes: una región interna que incluye iones unidos fuertemente a la superficie y una externa, o región de difusión donde la distribución de iones se determina por un balance de fuerzas electrostáticas y movimiento térmico aleatorio. De esta forma, el potencial en esta región decae con la distancia y se vuelve cero. Cuando se suministra un voltaje a una solución con partículas dispersas, las partículas son atraídas por el electrodo de polaridad opuesta, acompañadas de la capa fija y parte de la capa doble difusa. El potencial límite entre la unidad, en el plano de corte, entre la partícula con su atmósfera iónica y el medio que le rodea, se denomina potencial zeta [43].

El potencial zeta es una función de la superficie cargada de una partícula, cualquier capa absorbida en la interfase y la naturaleza y composición del medio en el que la partícula está suspendida.

El potencial zeta puede calcularse con la fórmula de Smoluchowski [42].

$$\text{Potencial Zeta (mV)} = 4\pi\mu/\varepsilon \cdot U \cdot 300 \cdot 300 \cdot 1000$$

donde: U = movilidad electroforética o velocidad de partícula x distancia (electrodo/voltaje), μ = viscosidad de la solución, ε = constante dieléctrica, U = velocidad de partícula

4.10. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El análisis por resonancia magnética nuclear (RMN) sirve para verificar la constitución química de la molécula, la disposición de sus enlaces y comprobar la ausencia de moléculas anómalas, debidas a reacciones secundarias, y de grupos terminales asociados a muestras de bajo peso molecular, debidos a que el proceso de polimerización no ha finalizado. El equipo empleado ha sido el espectrofotómetro Bruker AMX-300 el cual opera a 300,1 MHz (*Figura 19*).



Figura 21. Espectrofotómetro Bruker AMX-300 de RMN

La técnica de RMN se basa en determinar la absorción de energía, a frecuencias específicas, asociada a un cambio de orientación provocada por la irradiación de ondas radiomagnéticas en determinados núcleos atómicos que se hallan en el interior de un campo magnético. Existen varias técnicas de RMN: ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y ^{15}N -RMN. Se ha empleado la técnica de ^1H -RMN. Así pues, se determinará la absorción de los núcleos de hidrógeno que se hallan en regiones con distintas densidades de electrones y por lo tanto absorben a una intensidad de campo magnético diferente.

El procedimiento a seguir es el siguiente:

1. Se pesan entre 15-20 mg de muestra y se disuelve en DMSO en un tubo de muestras.
2. Se introduce el tubo en el equipo y se analiza.
3. Se obtiene el espectro de RMN de la estructura de los átomos de hidrógeno y se procesan los datos mediante el programa MestReC

Con el espectro obtenido se analiza:

- Número de señales: corresponde a la cantidad de tipos de hidrógenos que presenta cada compuesto.
- Áreas relativas de los picos (señales): son proporcionales al número de hidrógenos que producen la señal. Permiten asignar los picos a grupos de hidrógenos en particular.
- Acoplamiento de señales: fenómeno producido por las influencias magnéticas de los hidrógenos presentes en átomos adyacentes. Este hecho provoca que las señales se dividan en $n+1$ picos donde n es el número de protones vecinos equivalentes químicamente, pero distintos al núcleo observado. Así, pueden surgir dobletes cuando hay un protón vecino, tripletes cuando son dos, etc. Si el núcleo observado tiene protones vecinos distintos entre sí, los acoplamientos de ambos se multiplican.

4.11. Liberación de fármacos

4.11.1. Modelos de liberación en medios de distinta hidrofobicidad

Se ha realizado el estudio de liberación para la curcumina contenida en las diferentes β -ciclodextrinas. El estudio se ha realizado en tres medios: unos hidrofílicos formados por PBS 1x, PBS/FBS (90:10 v/v) y otro hidrofóbico formado por una mezcla PBS/EtOH (30:70 v/v).

El procedimiento a seguir es el siguiente:

1. Preparar los medios:
 - PBS 1x: Pesar 5,28 g de PBS, 0,165 g de Azida sódica y disolverlo en 550 mL de agua *Millipore*.
 - PBS/FBS: Pesar 5,28 g de PBS, 0,165 g de Azida sódica y disolverlo en 495 mL de agua *Millipore* y 55 mL de FBS.
 - PBS/EtOH: Pesar 5,28 g de PBS, 0,165 g de Azida sódica y disolverlo



en 385 mL de EtOH y 165 mL de agua *Millipore*.

2. Para cada muestra hacer 9 cuadrados de 2 cm² (equivalente a unos 10-20mg), ya que se necesitan 3 repeticiones de cada para cada medio. Anotar el peso exacto.
3. Cada trozo de muestra se coloca en un tubo de ensayo con 10mL del medio PBS 1x, PBS/FBS o PBS/etanol.
4. Durante cinco días en *eppendorfs* se recoge 1 mL de muestra de cada tubo. Para mantener el volumen constante se añade 1mL de medio por cada mL retirado. El primer día se toman: la primera medida a los 30 minutos, la segunda a la hora, a las dos horas, al cabo de cuatro horas y al cabo de 6 horas. Los siguientes días se recogen muestras pasadas 24 horas aproximadas respecto el día anterior.
5. Para hacer la medida final:
 - Se toma una muestra
 - Se dejan secar los tubos en la estufa a 37°C durante toda la noche.
 - Si no está suficientemente seco se le aplica el vacío.
 - Se pesan las muestras secas para también calcular la porosidad.
 - Se destruyen las muestras con 200 μ L de CHCl₃ y se les añade 1000 μ L de medio hidrofóbico (PBS/EtOH) a todos los eppendorf.
 - Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos.
6. Se mide la absorbancia de las muestras recogidas

4.11.2. Espectroscopia de ultravioleta (UV)

Las muestras de liberación recogidas se analizan en el espectrofotómetro de ultravioleta (UV-Vis) *SHIMADZU UV-3600* (Figura 20) de doble haz, para cuantificar la cantidad de fármaco liberado.



Figura 22. Espectrofotómetro UV-Vis de doble haz (modelo UV-3600, Shimadzu).

La técnica se basa en la absorción de luz ultravioleta y visible que se genera en una molécula al pasar un electrón de un orbital de baja energía a uno superior, al ser excitado. La diferencia energética entre los orbitales moleculares corresponde a las

longitudes de onda en la zona del ultravioleta visible (200-600nm en este caso). Para cuantificar los ensayos de liberación de la CUR se debe:

1. Encender el equipo y marcar los parámetros en el programa *UVProbe*, como la absorbancia máxima del fármaco. El equipo dispone de capacidad para colocar dos cubetas una para el medio y otra para la muestra.
2. Hacer la línea base con el medio usado en la liberación, la cubeta de cuarzo con el medio se deja en el equipo mientras se van analizando las muestras de ese medio.
3. Poner la muestra recogida en el *ependorf* en la cubeta de cuarzo que queda libre.
4. Hacer el espectro y guardarlo.

En los espectros absorbancia-longitud de onda se observa el pico correspondiente al fármaco en cada medio. Para determinar la concentración liberada de los fármacos en cada medio sus absorciones fueron procesadas usando una curva patrón de cada fármaco como referencia. La curva patrón se realiza para cada medio de liberación determinando la absorbancia a la longitud de onda del fármaco en ese medio de soluciones con una concentración del fármaco conocida.

4.12. Ensayos biológicos

4.12.1. Ensayo de Inhibición del crecimiento bacteriano

Las matrices de fibras obtenidas mediante electrospinning se han sometido a cultivos bacterianos para evaluar el efecto de la curcumina como agente antibacteriano. Las bacterias seleccionadas para llevar a cabo el estudio han sido: *Escherichia coli* (*E. coli*) del tipo Gram-negativo y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) del tipo Gram-positivo.

Para la realización de este ensayo se cortaron piezas de 1cm x 1cm de cada una de las matrices. Las placas de agar LB fueron sembradas con la bacteria correspondiente usando un hisopo estéril de dracón por el método de estrías en escoses para extender de manera homogénea las bacterias sobre toda la superficie de la placa. En cada placa se colocaron 5 muestras distribuidas de manera equidistantes en forma de hexágono. Así, en cada placa se colocó la muestra de matriz control que corresponde a las fibras de PLA sin carga, y las otras muestras fueron de las matrices de fibras de PLA cargadas con Ila curcumina encapsulada en las diferentes β -ciclodextrinas. Finalmente, se prepararon 2 placas por cada bacteria. Se aseguró la estanqueidad con Parafilm y se dejaron 24h en

una estufa a 37 °C en posición invertida para evitar el desecamiento del agar y mantener la humedad dentro de la placa. Además, se realizó la evaluación del efecto antimicrobiano de la curcumina, con la finalidad de contrastar el efecto de las matrices de las diferentes β -ciclodextrinas.

Finalmente, las placas fueron evaluadas a las 24 horas de su siembra con las bacterias. No se produce efecto de inhibición bacteriano para esta cantidad de curcumina. Para registrar este efecto las placas fueron fotografiadas.

4.12.2. Ensayo de citotoxicidad usando líneas celulares

El cultivo de células inmortalizadas (células derivadas de tumores, o células transformadas por elementos virales) es una metodología que permite tener de forma continua células. Estos cultivos celulares tienen como ventaja que no requieren el sacrificio de animales, ni el aislamiento y purificación celular. Por este motivo, los primeros ensayos de biocompatibilidad fueron realizados usando este tipo de células. El término biocompatibilidad *in-vitro*, puede entenderse como un material que no produce muerte celular por toxicidad celular (citotoxicidad) y se comporta como soporte apto para la adhesión y proliferación celular.

El cultivo de células inmortalizadas y células cancerígenas o tumorales es una metodología que permite tener de forma continua células. Estas células pueden sufrir muerte y/o daño celular cuando son expuestas a sustancias citotóxicas. La muerte de estas células ocurre por necrosis puesto que su programa de muerte celular o apoptosis no es funcional. El uso de estas líneas celulares es con la finalidad de evitar o disminuir el número de animales sacrificado para realizar ensayos de toxicidad celular o citotoxicidad.

Para este estudio se utilizaron células VERO, MCF-7, COS-1, MRC-5, PNT2 y PC-3. Las células fueron cultivadas en Dulbecco medio Eagle modificado (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina y 2 mM de L-glutamina a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ y 95% de aire. El medio de cultivo se cambió cada dos días y, para el subcultivo, las monocapas celulares se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y fueron tripsinizadas por incubación con tripsina-EDTA (0,25%) durante 2-5 min a 37 °C. La actividad de la tripsina fue detenida añadiendo medio de cultivo para obtener una suspensión celular.

Seguidamente se determinó la concentración de células en la suspensión por conteo celular directo usando el colorante vital azul de trypan al 4% para diferenciar células vivas de células muertas. Este colorante penetra en las células muertas y las colorea de azul. El principio de esta tinción superficial corresponde a la estabilidad de la membrana

celular, las células muertas tienen la membrana celular dañada y permiten la penetración del colorante al interior citoplasmático.

Para este ensayo, las muestras de matrices de fibras fueron pegadas a la placa de cultivo mediante silicona biocompatible. Piezas de 1cm x 1cm de matriz fueron colocadas en cada pocillo de placas de cultivo de 24 pocillos, dejando siempre la primera columna como control. En las columnas restantes se colocaron cuatro piezas de una misma matriz (de esta forma tendremos cuatro repeticiones por cada matriz y para cada tipo de línea celular). Antes, de iniciar el cultivo, las placas preparadas con las muestras fueron irradiadas durante 30 min con luz UV dentro de la cabina de flujo laminar.

Seguidamente las muestras fueron sembradas con 2×10^4 células (20 μ L de células en cada muestra/pocillo). Luego la placa fue incubada durante 30 min, y seguidamente, 1 mL de medio de cultivo fue añadido a cada pocillo y las placas fueron incubadas en condiciones de cultivo (5% CO₂ y 95% aire a 37 °C) durante 24h. Transcurrido este tiempo de cultivo, se añadieron 20 μ L de reactivo MTT en cada pocillo y se volvieron a colocar en la incubadora durante 2-3 horas, luego se aspiró el medio de cada uno de los pocillos, el mismo que fue desechado. Finalmente, se añade a los pocillos 200 μ L de la mezcla DMSO (Dimetilsulfóxido)/ Metanol/ Agua (20/70/10 en volumen), la placa se agita suavemente de manera manual durante 15 minutos para revelar el reactivo MTT que haya reaccionado con las células viables. Luego, el contenido de cada pocillo fue trasvasado a los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano. Estas placas fueron leídas en un lector ELISA cuantificando la absorbancia a 570 nm.

El ensayo de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro) es usado para determinar la viabilidad celular. Las células viables contienen deshidrogenasas que convierten el reactivo MTT (de color amarillo) en una sal de formazán (de color azul o violeta). Esta transformación del MTT se evidencia por la aparición intracelular de microcristales. La formación de formazán es cuantificable cuando los cristales son disueltos y se realiza lectura de absorbancia a 570 nm. Así, el número de células viables es directamente proporcional a la absorbancia a 570 nm.

Los resultados de absorbancia a 570 nm fueron procesados en una hoja de cálculo. La viabilidad celular fue expresada de manera relativa al control que corresponde al cultivo de las células en los pocillos sin ningún material (TCPS o placa de cultivo de tejidos). Los valores obtenidos para cada muestra de la misma matriz fueron promediados y graficados. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) fueron establecidas por análisis



estadístico usando el software OriginPro v 10.0 (Origin Microcal, USA).

5. Resultados y discusión

5.1. Formación de los complejos

5.1.1. Preparación de los complejos

La preparación de los complejos formados por β -ciclodextrina (β CD) y curcumina (CUR) fue el primer objetivo para realizar este PFC. La elección para usar β -ciclodextrina como molécula para la encapsulación de la curcumina se fundamenta en su estructura anular. Así, la curcumina puede ocupar el espacio central de la β -ciclodextrina. Por otro lado, la curcumina fue seleccionada por su estructura lineal, la cual la hace una molécula ideal para ser encapsulada en la β -ciclodextrina. La curcumina como droga es reconocida por su actividad antitumoral, aunque también se le asigna alguna actividad antibacteriana.

Para estudiar mejor, la formación de complejos β -ciclodextrina (β CD) y curcumina (CUR), se han preparado complejos con diferentes tipos de β -ciclodextrina (β CD) tales como: la forma 2-hidroxipropil (2-OHPP- β CD), la carboximetil (CM- β CD), la metil (M- β CD), y la triacetil (3A- β CD). Además, se ha preparado complejos con la forma lineal de la dextrina (DEX) que serán usados como controles.

En la *Tabla 3* se indica una breve descripción de las aplicaciones para cada una de las BCD estudiadas y la abreviatura de estos compuestos para su manejo simplificado en la elaboración de este proyecto; por ejemplo, la abreviatura 3A- β CD corresponde al compuesto triacetil- β -ciclodextrina. En la *Figura 22* se puede ver la estructura molecular de estos compuestos. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos compuestos de unidades de D-glucosa conectados por enlaces glicosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$. Las ciclodextrinas más comunes contienen 6 unidades o α CD, 7 unidades o β CD, y 8 unidades o γ CD. Las ciclodextrinas pueden ser modificadas por esterificación en 2, 3 y/o 6 posiciones. La disposición cíclica de las unidades origina una estructura que algunos la describen como un donut, otros como un embudo, etc., pero lo interesante es que la parte interna de las ciclodextrinas es no-polar lo cual le permite formar complejos con diversos compuestos no-polares, tales como lípidos, ácidos grasos y colesterol por mencionar los más comunes.

Tabla 3. Aplicaciones de las β -ciclodextrinas estudiadas en este proyecto

Nombre y Abreviatura	Aplicaciones
(2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina 2-OHPP- β CD	La solubilidad de drogas lipofílicas se incrementa linealmente con la concentración de la hidroxipropil- β -ciclodextrina en disolución acuosa porque se forman complejos. Los complejos se forman porque la droga ocupa la cavidad no polar de la ciclodextrina, lo cual mejora su solubilidad. Las disoluciones pueden ser liofilizadas para producir un polvo soluble. Esta ciclodextrina no es tóxica en conejos y ratones.
β -ciclodextrina β CD	Usada para solubilizar compuestos no polares, tales como ácidos grasos, lípidos y colesterol.
Carboximetil- β -ciclodextrina CM- β CD*	Carboxymethyl- β -cyclodextrin (CMBCD) is used in the development of recognition and separation technologies to resolve enantiomers based on chiral properties and size. Carboxymethyl- β -cyclodextrin is used in chiral selection and separation by capillary electrophoresis. Carboxymethyl- β -cyclodextrin is used in the development of drug delivery vehicles such as nanocarriers and as a nucleic acid transfection agent.
Metil- β -ciclodextrina M- β CD	Use to increase the solubility of non-polar substances such as fatty acids, lipids, vitamins and cholesterol for use in cell culture applications.
Triacetil- β -ciclodextrina 3A- β CD	Involved in studies of: <ul style="list-style-type: none"> • Controlled drug release of an inclusion complex • Biocompatible excipients for solubilization and deaggregation of cobalt bis(dicarbollide) derivatives in water • Extraction of aromatic amino acids • Emulsifiers • Polymerization initiation of cyclic esters • Sustained release matrix tablets
Dextrina DEX	Dextrins from corn starch are used in nutrition studies to understand the effects of fiber in diets on energy levels, intestinal flora, digestion and other physiological processes. Dextrin may be used or derivatized for use in areas such as the stimulation of immune response and colitis research. Dextrins from potato starch are used in nutrition studies to understand the effects of fiber in diets on energy levels, intestinal flora, digestion and other physiological processes.

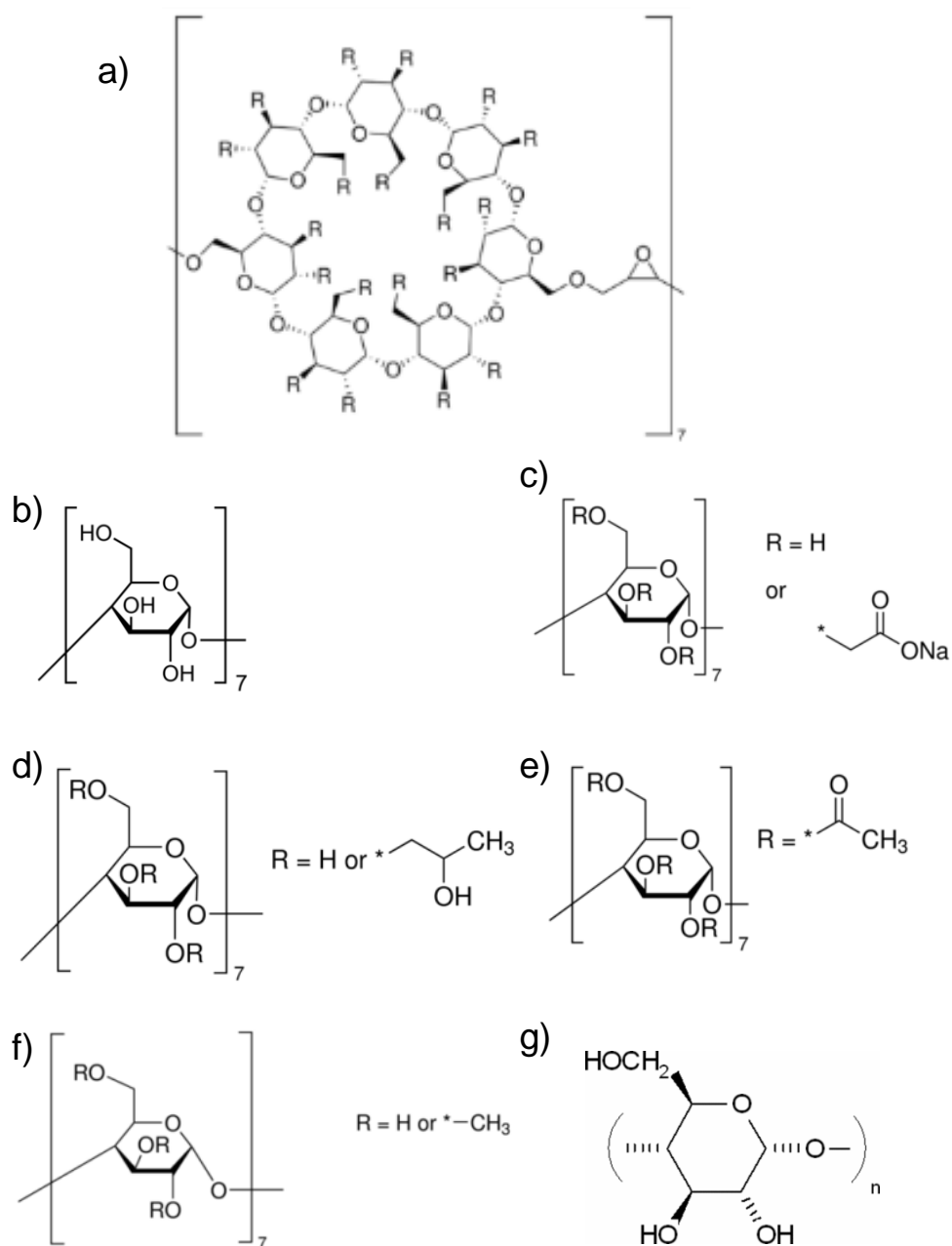


Figura 22. Estructura molecular de los compuestos: a) estructura general de las β -ciclodextrina; b) β -ciclodextrina; c) carboximetil- β -ciclodextrina; d) hidroxipropil- β -ciclodextrina; e) triacetil- β -ciclodextrina; f) metil- β -ciclodextrina; g) dextrina

Los complejos fueron formados por precipitación haciendo reaccionar curcumina y la ciclodextrina en proporción molar de 1:2 (M:M). Ambas disoluciones fueron acuosas y se dejaron en agitación durante 24 h para facilitar la formación de los complejos los cuales fueron recogidos por filtración, luego fueron lavados y secados en estufa para eliminar el agua. Posteriormente, estos complejos fueron caracterizados.

5.2. Caracterización de los complejos

5.2.1. Composición

5.2.1.1. FTIR

Los complejos obtenidos fueron analizados por espectroscopia de infrarrojo (FTIR) en el modo atenuado. Los espectros de FTIR fueron analizados cualitativamente para establecer que los productos obtenidos contenían tanto la ciclodextrina como la droga curcumina.

En la Figura 23 se muestra el espectro del complejo β CD/CUR. El espectro es complejo debido a las múltiples señales correspondientes a la curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona) en la región entre 500 a cerca de 2000 cm^{-1} . Mientrás que la ciclodextrina tiene grandes picos de absorción alrededor 1020 y 1070 cm^{-1} y que se corresponden al acoplamiento Vs del $-\text{C}-\text{C}/\text{C}-\text{O}$, respectivamente. Además, a 1150 cm^{-1} muestra la Vas del $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ del enlace glicosílico. También, destaca la banda alrededor de 3500 cm^{-1} que corresponde a los $\text{OH}-$.

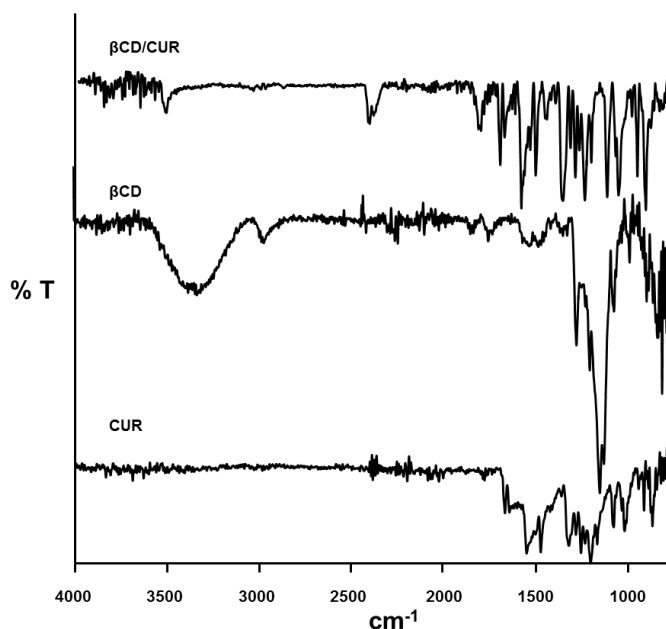


Figura 23. Espectro IR del complejo $\beta\text{CD/CUR}$

Bandas muy intensas fueron observadas para las ciclodextrinas de la forma 3-acetil alrededor de 1300, 1400 y 1750 cm^{-1} (Fig 24a), y de manera similar para la carboximetil (Fig 24c). Mientrás que la 2-hidroxipropil y la metil muestran algunas bandas en estas regiones pero que se caracterizan por su baja intensidad. Finalmente, se puede observar que el espectro predominante en los complejos corresponde a la CUR, pero existen alguna bandas cuyas intensidades cambian cuando se forman los complejos con las ciclodextrinas, particularmente las bandas alrededor de 1700 cm^{-1} . Sin embargo, el espectro del complejo 3A- β CD/CUR (Fig 24a) muestra claramente que las señales de los grupos sustituyentes en la β -ciclodextrina pueden dominar el espectro.

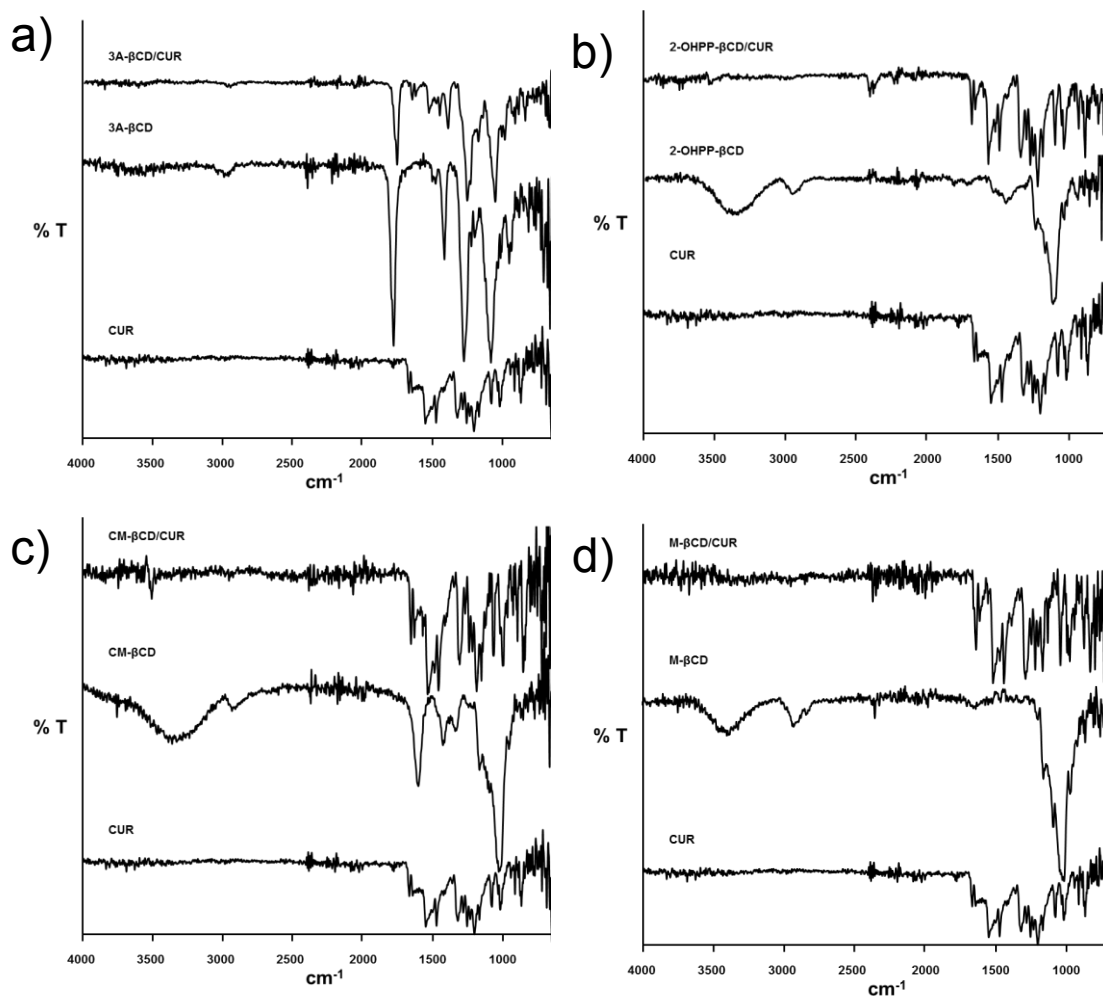


Figura 24. Espectros FTIR de los complejos ciclodextrina/curcumina. **a)** 3A- β CD/CUR, **b)** 2OHPP- β CD/CUR, **c)** CM- β CD/CUR, **d)** M- β CD/CUR,

5.2.1.2. RMN

Se realizaron espectros de ^1H -RMN para cuantificar la ciclodextrina y la curcumina en los complejos formados. Para ello, las muestras de los complejos fueron solubilizados en DMSO-deuterado. Sin embargo, estos complejos muestran un gran solapamiento en las señales de los protones de la curcumina y los de la ciclodextrinas (*Figura 25*), lo cual no permite utilizar estos espectros de RMN para cuantificarlos cuando forman complejos.

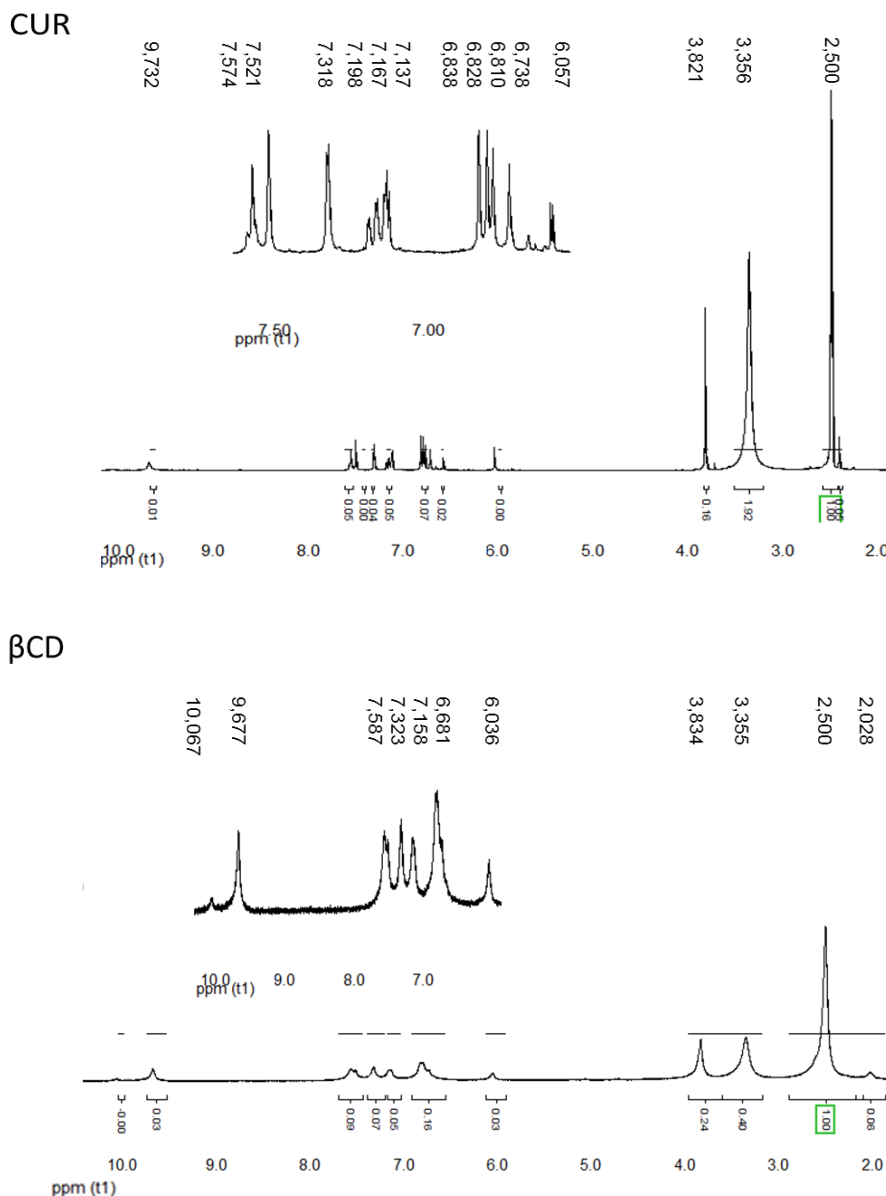


Figura 25. Espectros de ^1H -RMN de la curcumina (CUR, espectro de arriba) y de su complejo formado con la β CD (β CD/CUR, espectro de abajo). En cada espectro se muestra una ampliación de la región de las bandas de menor intensidad.

En la *Figura 26* se muestran los espectros RMN de protón para los diferentes complejos formados, tal como se indicó anteriormente el solapamiento de las señales de protón de la curcumina y ciclodextrina imposibilita la cuantificación molar de ambos componentes en estos complejos.

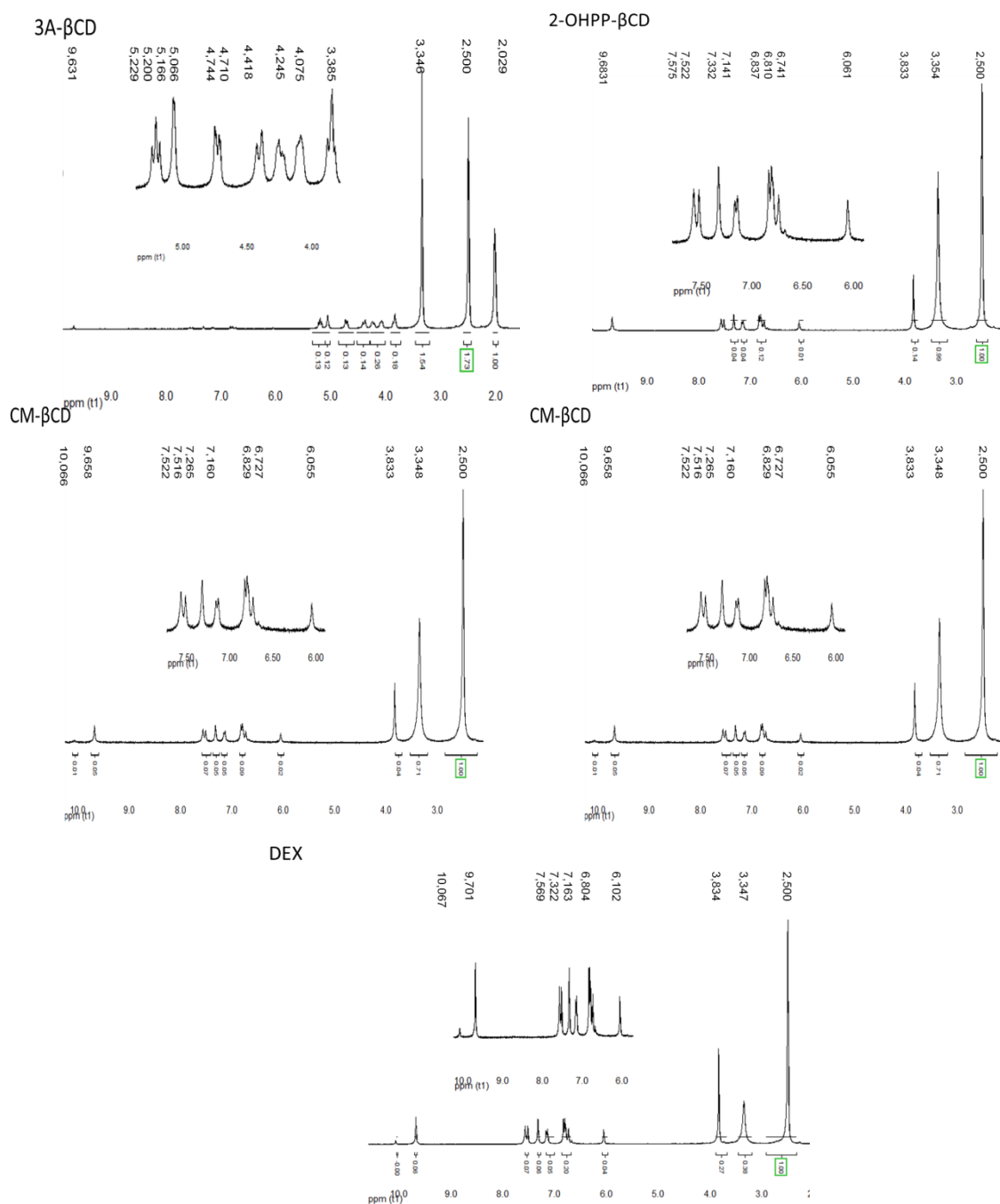


Figura 26. Espectros ^1H -RMN de los complejos ciclodextrina/curcumina: 3A-βCD/CUR, 2OHPP-βCD/CUR, CM-βCD/CUR, M-βCD/CUR, y DEX/CUR.

5.2.2. Tamaño de los complejos ciclodextrina/curcumina

La forma molecular de anillo cónico establecido para las ciclodextrinas se basa en su estructura de ciclo. El tamaño varía dependiendo del número de unidades de glucosa que conforman el ciclo. Así, para las β -ciclodextrinas se ha establecido un diámetro de 0.78 nm y mientras que para las α -ciclodextrinas y γ -ciclodextrinas sus diámetros son de 0.57 nm y 0.95 nm, respectivamente. En todos los casos las ciclodextrinas tienen una altura de 0.78 nm. Sin duda alguna, el tamaño del espacio no-polar de estas moléculas restringe la ocupación de este espacio por las drogas cuando forman complejos.

En este proyecto se ha medido el diámetro hidrostático efectivo de las moléculas de ciclodextrina y de sus complejos con curcumina. El método usado fue el DLS o de dispersión de luz. Este método mide el tamaño de las partículas en suspensión; así, para este trabajo se han medido los diámetros en suspensión en agua y en suero fetal bovino (FBS) como una aproximación más fisiológica.

En la Tabla 4 se muestran los resultados para las medidas de los complejos CD/CUR. En el caso de las medidas en agua, se observó diferentes comportamientos. La CUR mostró un tamaño de partícula de 5.27 nm, por un lado esto puede corresponder a la agregación de las moléculas o simplemente puede corresponder a un movimiento de rotación con un radio de Stokes mayor a su tamaño molecular. Sin embargo, la β CD muestra un tamaño de 3.94 nm. Cuando se forma el complejo β CD/CUR el diámetro fue de 3.88 nm y prácticamente no cambia de tamaño. Esto podría sugerir que la curcumina estaría ocupando el espacio no-polar de la β CD, puesto que el complejo al igual que la β CD estaría estabilizados por los puentes de hidrógeno que se forman en la suspensión de agua.

Por otro lado, cuando la β CD tiene alguna sustitución como la 2-hidropropil muestra un incremento en su tamaño, mientras que sustituciones como la triacetil y la metil producen una reducción del diámetro hidrodinámico en la molécula con valores de 2.66 y 2.77 nm. Pero, cuando forman complejos el diámetro se incrementa en todos los casos, con valores de 5.66 nm, 4.84 nm, y 5.39 nm para los complejos 2-OHPP- β CD/CUR, 3A- β CD/CUR y M- β CD/CUR, respectivamente. Pero la sustitución carboximetil-, no produce mayor variación en el diámetro de la ciclodextrina libre o formando complejo con curcumina, mostrando valores de 3.84 nm y 3.75 nm, respectivamente. Este resultado puede interpretarse desde el hecho que la sustitución carboximetil- es una sustitución compensada, porque permite el comportamiento como aceptora y donadora para establecer los puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. Finalmente, la dextrina cuya estructura es lineal, mostro un cambio de diámetro de 2.68 nm a 7.21 nm, desde la forma libre a la forma de complejo con curcumina.

El comportamiento de las partículas en FBS fue más complejo y ello puede entenderse porque en el suero existen moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas y este hecho puede dar mayor libertad de movimiento a las moléculas, con lo cual su movimiento en la suspensión de partículas muestra mayor libertad y con el consecuente incremento en el tamaño de los diámetros efectivos.

Tabla 4. Diámetro hidrostático (diámetro efectivo) e índice de polidispersidad (PDI) de los complejos de β -ciclodextrina/curcumina medidos por DLS en suspensión preparada en agua y suero fetal bovino (FBS).

Compuesto	\varnothing Efectivo en H ₂ O (nm)	PDI en H ₂ O	\varnothing Efectivo en FBS (nm)	PDI en FBS
CUR	5,27	7,58	11,95	8,41
β CD	3,94	3,69	11,00	5,21
β CD/CUR	3,88	1,96	2,56	1,81
2-OHPP- β CD	5,66	11,80	7,00	7,17
2-OHPP- β CD/CUR	6,86	15,94	6,79	0,77
3A- β CD	2,66	12,82	11,59	8,92
3A- β CD/CUR	4,84	2,08	22,66	6,72
CM- β CD	3,84	0,41	2,71	13,44
CM- β CD /CUR	3,75	2,05	3,61	3,23
M- β CD	2,77	13,79	18,64	5,98
M- β CD /CUR	5,39	2,30	9,23	2,52
DEX	2,68	11,77	13,13	6,57
DEX /CUR	7,21	3,68	12,66	4,84

5.2.3. Carga electrostática de los complejos β -ciclodextrina/curcumina

La carga electrostática de los complejos de las β -ciclodextrinas con la curcumina fue analizado por la medida electroforética de los complejos en suspensión en agua. En la *Tabla 5* se muestran los valores del potencial Z que corresponden a la carga de la envoltura del complejo, y los valores de movilidad electroforética.

La curcumina muestra un potencial Z negativo de -0.87 mV mientras que la β CD tiene un potencial de 0 mV lo que indica un equilibrio entre sus cargas. Sin embargo, cuando se forma el complejo β CD/CUR el potencial fue de -1.74 mV indicando que ocurren movimientos de las cargas debido a las interacciones moleculares al momento de formar el complejo. Esto mismo ocurre con la metil- β CD/CUR produciéndose un potencial de -1.75 mV. Algo contrario fue observado con el sustituto 2-hidroxipropil, esta ciclodextrina libre mostro un elevado potencial negativo (-5.48 mV) en su forma libre, pero cuando forma el complejo 2-OHPP- β CD/CUR su potencial fue de 0 mV. Lo mismo ocurre para la dextrina lineal, en el complejo DEX/CUR (0 mV), pero ella parte de un potencial +0.87 mV en su forma libre.

Contrariamente a la β CD, la 3A- β CD y la CM- β CD muestran potenciales positivos en sus formas libres, +1.74 mV y +1.75 mV, respectivamente. Pero cuando forman sus respectivos complejos con curcumina, los potenciales resultantes fueron de +0.87 mV y -1.74 mV, respectivamente. Así, es claro que una reorganización en la distribución de cargas es observada cuando se forman los complejos ciclodextrinas/curcumina. Esto podría explicar porque los espectros de FTIR y ^1H -RMN son complejos en sus señales y no solo corresponden a la superposición de los espectros de las moléculas libres.

Tabla 5. Potencial Z y movilidad electroforética de los complejos formados entre las diferentes β CD y la curcumina.

Compuesto	Potencial Z (mV)	Movilidad ($\mu\text{S}/(\text{V}/\text{cm})$)
CUR	-0,87	-0,07
β CD	0	0
β CD/CUR	-1,74	-0,14
2-OHPP- β CD	-5,48	-0,43
2-OHPP- β CD/CUR	0	0
3A- β CD	1,74	0,14
3A- β CD/CUR	0,87	0,07
CM- β CD	1,75	0,14
CM- β CD /CUR	-1.74	-0.14
M- β CD	0	0
M- β CD /CUR	-1,75	-0,14
DEX	0,87	0,07
DEX /CUR	0	0

5.3. Optimización de la técnica de electrospinning

Una vez preparados los complejos entre las diversas β CD y la curcumina, se procedió a realizar el conformado de las fibras mediante la técnica de electrospinning para cargar los complejos. Para ello, la primera consideración fue establecer los parámetros óptimos de electrohilado, con ellos se realizaron la obtención de matrices de fibras acumulando el tiempo las fibras electrohiladas, y finalmente estas fueron caracterizadas.

5.3.1. Parámetros operacionales óptimos

Para realizar con éxito el electrospinning (electrohilado) de cualquier polímero se han de tener en cuenta tres clases de parámetros: 1) de la disolución, 2) operacionales, y 3) ambientales. En la actualidad, existe abundante información sobre esta técnica y el número de publicaciones sobre electrospinning de polímeros biodegradables es muy extenso, en particular los relativos al grupo de los poliésteres, como el PLA.

El PLA de alto peso molecular puede ser electrohilado en condiciones óptimas a partir de una disolución del 10 % p/v preparada en una mezcla de cloroformo-acetona (2:1, v/v) y aplicando un potencial de 15 KV entre la aguja y colector separados por una distancia de 15 cm, siendo el flujo del polímero de 10-5 mL/h. Con estas condiciones se obtienen fibras con diámetros de micras. Estos trabajos fueron considerados como referencia para el actual PFC desde que fueron desarrollados en el mismo laboratorio.

En el PFC actual, se planteó como objetivo la preparación de microfibras de PLA cargadas con curcumina encapsulada en β -ciclodextrinas. Por ello, las disoluciones de PLA fueron preparadas al 10 % p/v en cloroformo-acetona (2:1, v/v).

La disolución a electrohilar consistió de una mezcla de 10 mL de PLA al 8% p/v y 0,024g de complejo, es decir, un 3% del total en peso. Como parámetros operacionales iniciales para un sistema de electrospinning vertical, se fijó el potencial electrostático en 15 KV, la distancia aguja-colector a 15 cm y el flujo a 10 mL/h. Las fibras obtenidas fueron muestreadas y observadas en un microscopio óptico y de acuerdo a la morfología evaluada los parámetros operacionales fueron cambiados para mejorar la calidad de las fibras. En la *Tabla 6* se muestran los mejores parámetros operacionales probados para cada muestra de las mezclas PLA y complejos β CD/CUR y β CD-sustituida/CUR.

Tabla 6. *Parámetros operacionales usados para obtener microfibras de PLA con complejos ciclodextrina/curcumina*

Muestra	Voltaje (KV)	Flujo (mL/h)	Aguja-Colector (distancia, cm)
PLA	7,5 - 28	5 - 10	10 - 20
PLA/DEX	10 - 25	7,5 - 10	15
PLA/CUR	10 - 25	7,5 - 10	15
PLA/DEX/CUR	15 - 25	10	15
PLA/ β CD/CUR	15 - 25	10	15
PLA/2-OHPP- β CD/CUR	15 - 25	10	15
PLA/3A- β CD/CUR	15 - 25	10	15
PLA/CM- β CD/CUR	15 - 25	10	15
PLA/M- β CD/CUR	15 - 25	10	15

En el caso del parámetro distancia aguja-colector (15 cm) este era el único eficiente en la mayoría de casos. Esto se explica porque este parámetro influye en la evaporación del solvente usado en la preparación de la disolución del polímero. Así, esta distancia permite una adecuada evaporación de la mezcla cloroformo/acetona (2:1, v/v), lo cual permite obtener fibras secas sobre el colector. En lo referente al flujo de la mezcla, se observó que en general, las mejores condiciones fueron conseguidas con flujo de 10 mL/h, este parámetro obedece a la viscosidad de la disolución. Finalmente, el parámetro del potencial electrostático fue el más variado, de este parámetro depende la formación del cono de Taylor, el cual obedece al reordenamiento de cargas de la disolución del polímero, tanto del polímero y el solvente, en la gota debe ocurrir un desbalance de las cargas hacia la repulsión y por ello se favorece el desplazamiento atractivo hacia el colector.

A pesar de las pruebas realizadas con diferentes parámetros, dada la obtención de buenos resultados, para todas las matrices se conservaron los mismos parámetros: voltaje 15 KV; flujo 10 mL/h; distancia 15 cm. Asimismo, se puede hacer notar que la carga electrostática de los complejos no influyen significativamente en las propiedades electrostáticas de la disolución del PLA durante el procesado por electrospinning, debido a que estos complejos solo corresponden a un 3% en peso en la disolución de PLA.

5.4. Caracterización de las matrices

5.4.1. Diámetro de las fibras mediante SEM

Para establecer un claro análisis de la morfología de las fibras de PLA cargado con la curcumina encapsulada en las diferentes ciclodextrinas, las muestras fueron procesadas para obtener imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM), tal como se muestra en *Figura 27* y *Figura 28*. En general, en las imágenes a menor aumento se puede observar que las fibras resultantes del electrospinning se corresponden a fibras distribuidas al azar, y con morfología cilíndrica en disposición rectilínea. A mayor aumento se observan detalles superficiales de las fibras mostrándose que en la mayoría de ellas la superficie es lisa.

Como parte de la caracterización de las fibras se han medido los diámetros y en todos los casos las matrices de PLA cargadas con la curcumina encapsulada han presentado una distribución normal para la distribución de frecuencias de los diámetros. Estas distribuciones se han podido ajustar a un modelo Gaussiano (*Figura 27* y *Figura 28*).

La estadística descriptiva para las medidas de los diámetros se muestra en la *Tabla 7*. Para analizar los cambios en los diámetros de las fibras cargadas con los diferentes complejos se han tomado como medidas de referencia los diámetros de la matriz de PLA (927 ± 56 nm) y la de PLA/CUR (620 ± 31). Así, la presencia de curcumina puede forzar una interacción entre las cadenas del PLA durante el conformado de las fibras.

Tabla 7. Diámetros de las fibras de PLA cargadas con complejos de las diversas β -ciclodextrinas y curcumina

Muestra	Promedio (nm)	SD (nm)
PLA	927	56
PLA/DEX	558	21
PLA/CUR	620	31
PLA/DEX/CUR	879	35
PLA/ β CD/CUR	680	29
PLA/2-OHPP- β CD/CUR	506	19
PLA/3A- β CD/CUR	518	18
PLA/CM- β CD/CUR	574	20
PLA/M- β CD/CUR	542	18

El complejo β CD/CUR cargado en las fibras de PLA mostro un diámetro promedio de 680 ± 29 nm, siendo un poco mayor al observado para el PLA/CUR. Sin embargo todos los complejos de β CD mostraron un diámetro menor en el rango de 506 ± 19 nm a 574 ± 20 nm , lo cual se corresponde al PLA cargado con los complejos 2-OHPP- β CD/CUR y CM- β CD/CUR, respectivamente. Así, el conformado de las fibras de PLA cargadas con estos complejos no parece ser afectado ni por el tamaño de los complejos, ni por su carga electrostática.

Sin embargo, es interesante hacer notar que el oligosacárido lineal de la dextrina tiene efecto sobre el diámetro de las fibras cuando se encuentra libre o formando complejo con la curcumina. Las fibras de PLA cargadas con la dextrina lineal muestran un diámetro de 558 ± 21 nm, y cuando las fibras se conforman cargadas con el complejo DEX/CUR, el diámetro de las fibras se incrementa a 879 ± 35 nm, acercándose de manera significativa al valor de las fibras de PLA (927 ± 56 nm). Estos resultados sugieren que la dextrina lineal puede interaccionar con las cadenas de PLA, pero cuando está formando complejos con la curcumina (DEX/CUR) tiene sus sitios de interacción ocupados y por ello durante el conformado de las fibras de PLA, no afecta al diámetro.

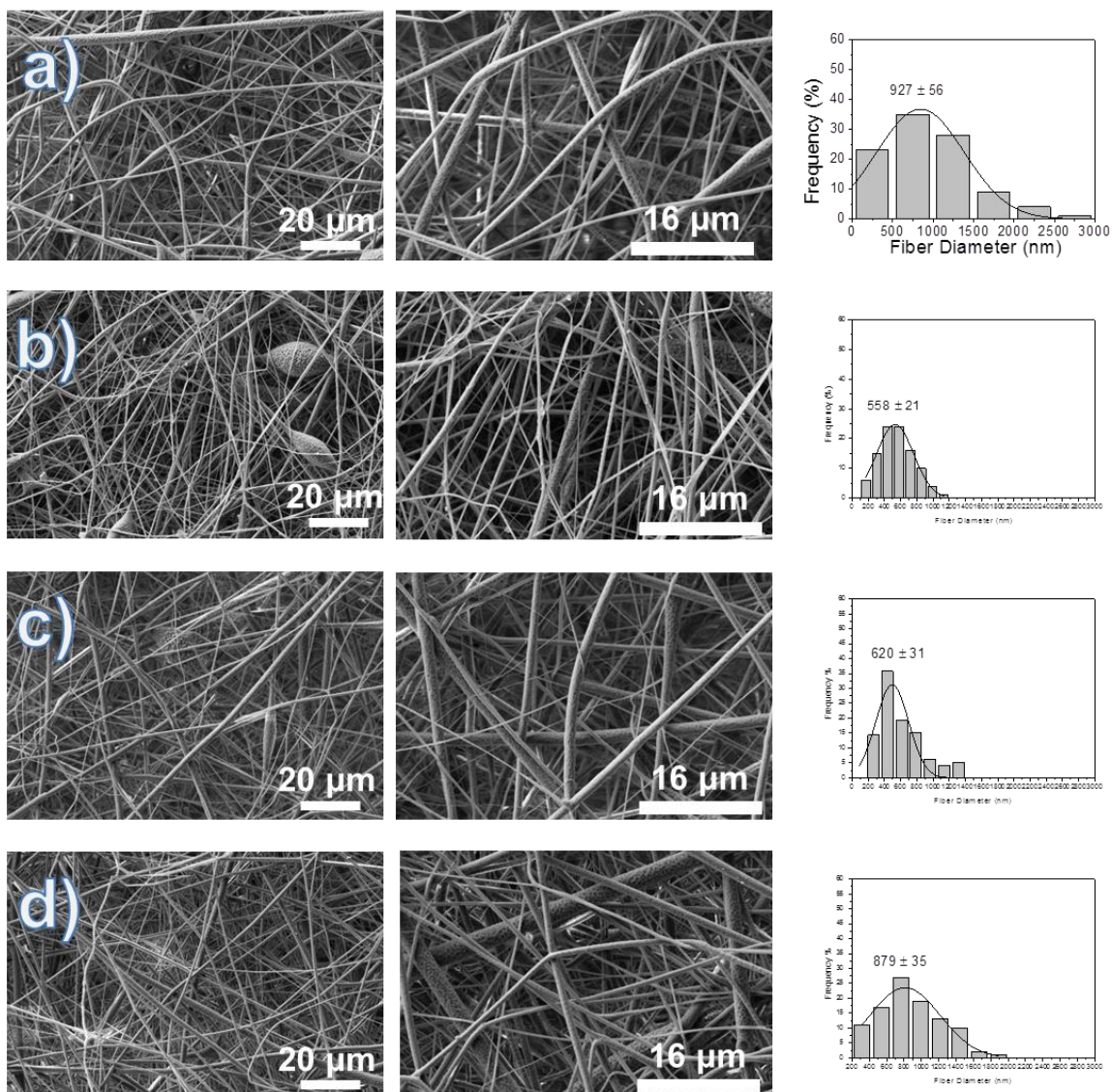


Figura 27. Imágenes de las fibras mediante SEM y distribución de su diámetro:
a)PLA 8%; b)PLA/CUR; c)PLA-DEX; d)PLA-DEX/CUR

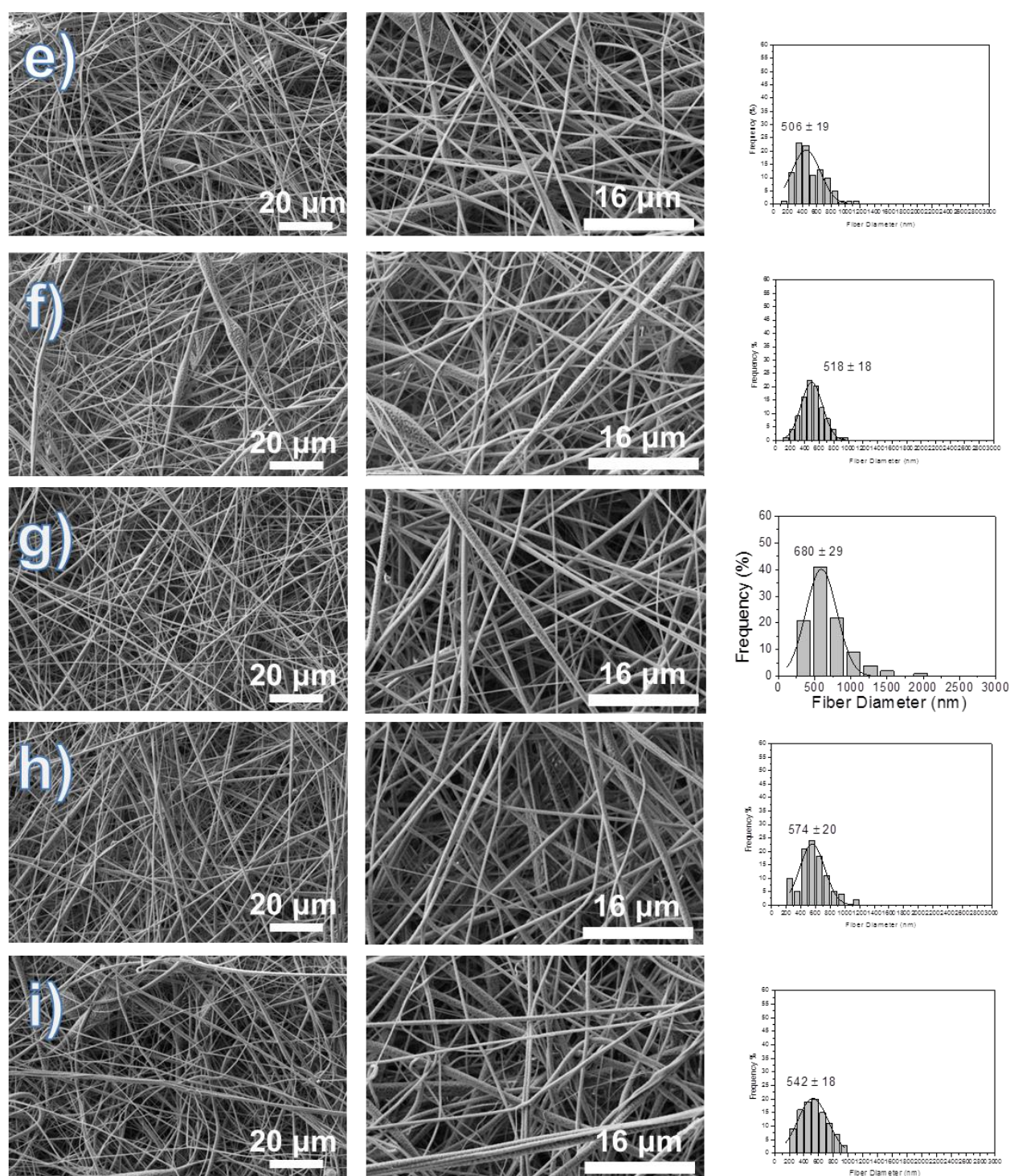


Figura 28. Imágenes de las fibras mediante SEM y distribución de su diámetro:

e)PLA-2-OHPP- β CD; f)PLA-3A- β CD; g)PLA- β CD; h)PLA-CM- β CD; i)PLA-M- β CD

5.4.2. Ángulos de contacto

Los ángulos de contacto fueron estudiados para determinar las características de hidrofobicidad de las superficies de las matrices de las fibras. En la *Figura 29* se muestran los resultados de los ángulos de contacto medidos con gotas sésiles de agua y suero fetal bovino o FBS (*Figura 29a* y *29b*, respectivamente). En general todas las matrices de PLA cargadas con los complejos de β CD/CUR y β CD-sustituida/CUR mostraron ángulos de contacto hidrofóbicos de manera similar al PLA sin carga, es decir, ángulos de contacto con valores alrededor de 120°

Por otro lado, cuando la gota sésil para la medida del ángulo de contacto fue el FBS, se observaron cambios para el PLA que mostro valores de superficie hidrofóbica de 120° . El PLA cargado con CUR y el complejo 3A- β CD/CUR mostraron valores cercanos a 100° . Otros complejos como el de CM- β CD/CUR y el β CD/CUR mostraron valores cercanos a 80° . Lo cual evidencia un cambio de tendencia de la superficie hacia la hidrofiliidad.

Este hecho es importante, pero se ha de considerar que las medidas con agua corresponden a un entorno polar, y las medidas con FBS aun siendo un medio acuoso corresponde a un medio muy complejo, desde que diversos componentes fisiológicos pueden ser encontrados, en su mayoría la albumina sérica y otras proteínas son los componentes más importantes, así en este entorno acuoso como es el FBS pueden coexistir componentes polares y no-polares, y ambos de manera conjunta pueden dar una medida compleja (en su interpretación) cuando se determina el ángulo de contacto con este líquido. Sin embargo, y a pesar de esta complejidad se puede rescatar su significado desde que se trata de un fluido biológico.

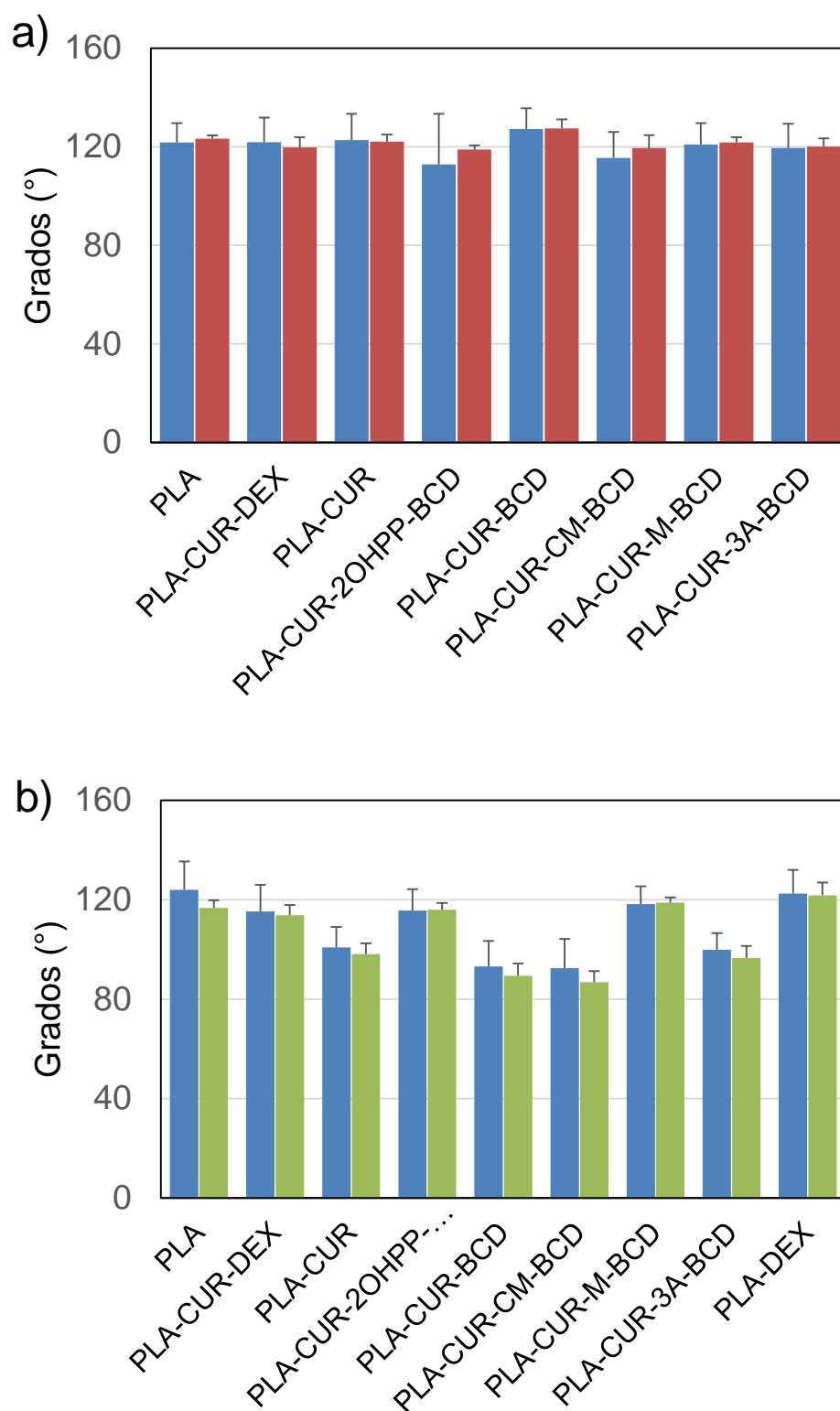


Figura 29. Ángulos de contacto medidos sobre las matrices de fibras de PLA cargadas con los complejos de β CD y curcumina. Medidas realizadas con gotas de **a)** agua, y **b)** FBS.

5.4.3. Análisis de FTIR de las matrices de fibras cargadas

Se ha demostrado que el PLA procesado por electrospinning incrementa su cristalinidad. La espectroscopia FTIR puede dar información sobre la conformación y cristalinidad, aunque su interpretación en el caso del PLA es difícil debido a sus diferentes conformaciones moleculares y empaquetamiento. Sin embargo, algunas observaciones pueden ser realizadas.

La absorbancia de la banda del carbonilo alrededor de 1757 cm^{-1} tiene pequeña correlación con los cambios conformacionales de la cadena principal. Por este motivo esta banda puede ser usada como una banda de referencia para corregir las fluctuaciones debido a las diferencia en el espesor de las matrices.

La comparación entre la absorbancia de la banda a 1268 cm^{-1} ($\nu(\text{CH})+\nu(\text{C-O-C})$) que indica una conformación al azar, y la banda 1209 cm^{-1} ($\nu(\text{C-O-C})+\nu(\text{CH}_3)$) que se observa como un hombro de la banda 1182 cm^{-1} , es una banda que indica conformación helicoidal 107; al respecto se ha reportado que las moléculas adoptan una conformación helicoidal más ordenada cuando la banda a 1268 cm^{-1} disminuye y la banda a 1209 cm^{-1} se incrementa.

La relativa intensidades entre las bandas 1382 cm^{-1} ($\nu(\text{CH}_3)$) y 1092 cm^{-1} ($\nu(\text{C-O-C})$) cambian bajo el annealing de las muestras (p.e., cuando se incrementa la cristalinidad). Específicamente, la relativa intensidad de las bandas a 1360 cm^{-1} y 1134 cm^{-1} fue incrementada. Finalmente, la banda de absorción a 921 cm^{-1} es característica de la forma- α y corresponde al esqueleto C-C con estiramiento del CH_3 .

El espectro FTIR de la matriz de fibras de PLA y los espectros del PLA cargado con los complejos muestran algunos aspectos interesantes (Figura 30). En la mayoría de los casos, no se observaron grandes diferencias entre las bandas de absorción de PLA y el PLA cargado con los complejos de β -ciclodextrinas y la curcumina. La región espectral que se muestra ($700\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$) es sensible a la conformación molecular y cristalinidad. Sin embargo, el espectro FTIR de las matrices de PLA cargado con los complejos de β -ciclodextrinas y la curcumina demostraron la encapsulación de estos complejos, tal como se observa por las bandas de baja intensidad que se observan cerca de la banda típica del éster. Básicamente, múltiples señales son observadas en la región entre $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, donde las bandas asociadas al grupo carbonilo y anillos aromáticos pueden aparecer. Estos anillos son propios de la curcumina y de la glucosa (Figura 22), y en consecuencia estas señales pueden ser detectadas en los espectros del PLA cargado con estos complejos.

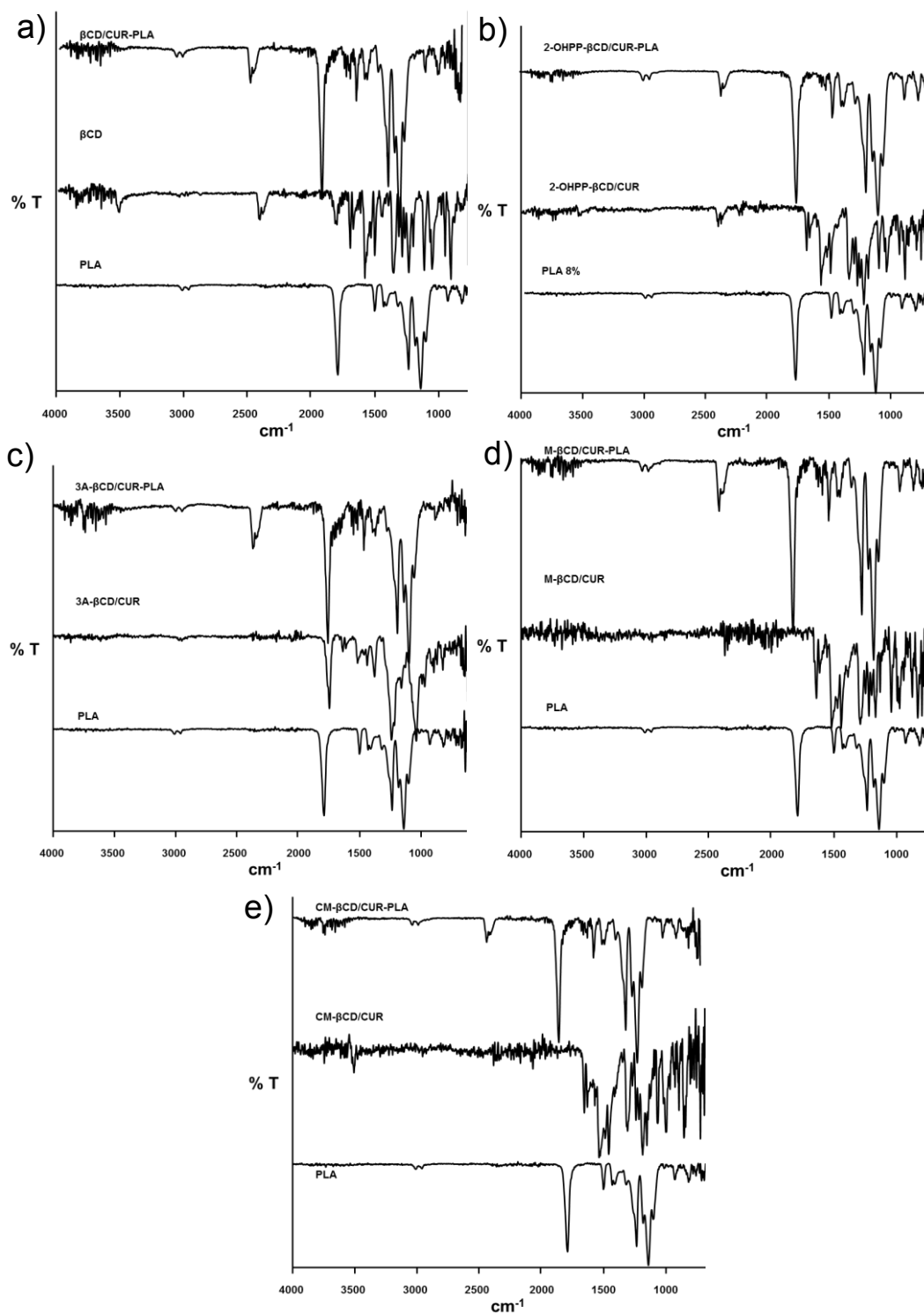


Figura 30. Espectros FTIR de los complejos ciclodextrina/curcumina cargados en fibras de PLA. a) β CD/CUR; b) 2OHPP- β CD/CUR, c) 3A- β CD/CR, d) M- β CD/CUR, e) CM- β CD/CUR.

5.5. Actividad de las matrices

5.5.1. Liberación de la curcumina encapsulada como complejo en las nanofibras de PLA

En la *Figura 31* se muestran los perfiles de liberación de la curcumina desde las fibras cargadas con los complejos de β -ciclodextrina/curcumina. El seguimiento de la liberación fue realizado por espectroscopia UV-Vis siguiendo la evolución de liberación del cromóforo de la curcumina.

La liberación fue realizada en diferentes medios de liberación. La liberación en etanol fue realizado de acuerdo para producir un hinchamiento en las fibras de PLA y provocar la liberación rápida y total de la curcumina cargada (Fig 31a). Otro medio considerado para la liberación fue el PBS, esta es una disolución salina en base a fosfatos (pH 7.2-7.4), y se considera una disolución fisiológica (Fig 31b). En PBS ocurre una liberación anómala de la curcumina, en primer lugar ocurre un efecto de rápida liberación en el rango de 35% a 80% dependiendo del complejo, esta liberación se produce durante las 48 horas de liberación, luego la droga es retenida en la matriz y solo se observa liberación alrededor del 20% transcurridas 120 horas de incubación. Finalmente, se estudió la liberación en PBS suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), lo cual puede representar un medio de liberación mucho más fisiológico. En este último medio (Figura 31c) se observó una liberación lenta y progresiva en el tiempo, siendo las 96 horas de liberación susceptible para mostrar diferencias entre las matrices de PLA cargadas con los diferentes complejos. Así, los complejos de ciclodextrina formados con 2-hidropiril- β CD y triacetil- β CD liberan cantidades importantes de curcumina a las 96 horas, aproximadamente el 80% y 60 % de su carga, respectivamente. Este comportamiento también ocurrió en las fibras de PLA cargadas con curcumina, liberando alrededor del 70%. Un segundo grupo, tal como los complejos formados por carboximetil- β CD y la metil- β CD liberan alrededor del 70% de la carga de curcumina a las 148 horas, mientras que los complejos formados con la dextrina lineal liberan solo el 50% , y la β CD/CUR libero en este mismo tiempo cerca del 40% de su carga.

Estos resultados estarían indicando que la formación de los diferentes complejos de las β -ciclodextrinas/curcumina tienen influencia para la liberación de la curcumina en medio semejantes a los fisiológicos.

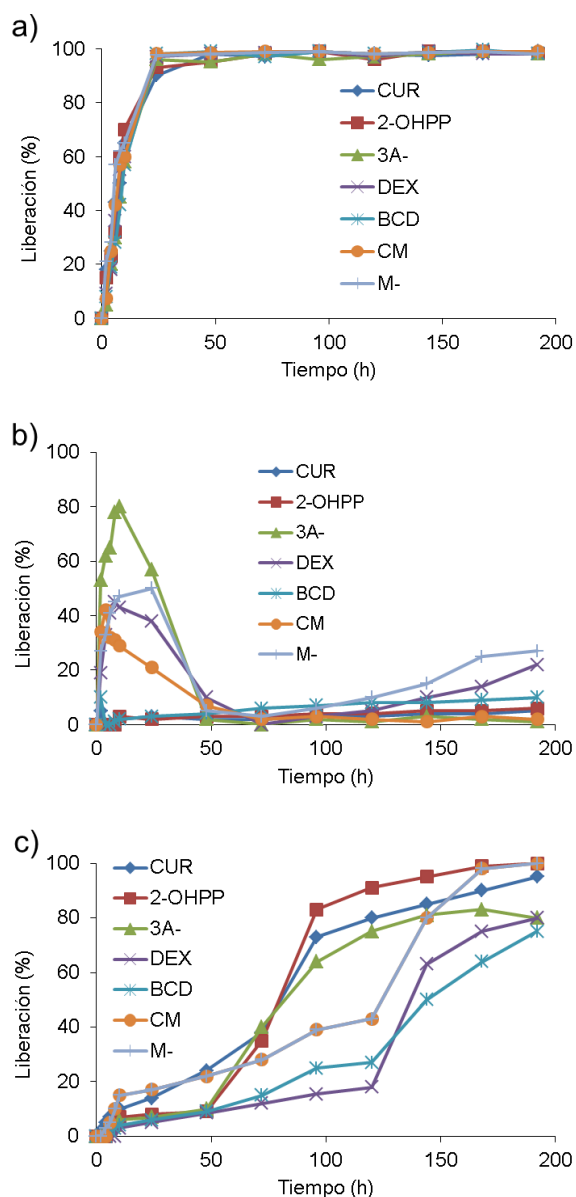


Figura 31. Curvas de liberación de curcumina desde los complejos de ciclodextrina/curcumina cargados en las fibras de PLA. a) liberación en PBS-etanol (30:70, v/v), b) PBS, y c) PBS-FBS (90:10, v/v).

5.5.2. Inhibición del crecimiento bacteriano

El ensayo de inhibición de crecimiento bacteriano fue realizado para observar la potencia de la actividad antimicrobiana que puede tener la curcumina en las diferentes formas de complejo. En la Figura 32 se muestran los resultados para las diferentes matrices de complejos evaluados en este ensayo con las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus*

aureus como representantes de los grupos Gram-negativas y Gram-positivas, respectivamente. Es cierto que la curcumina muestra cierta actividad antibacteriana, sin embargo, en el ensayo realizado durante 24 horas no hemos observado esta actividad antibacteriana. El medio de agar sólido para cultivar las bacterias debe ser similar al medio de liberación PBS-FBS. En este sentido la liberación debe ser sostenida y en tiempo corto como 24 horas no es posible conseguir una liberación de curcumina en concentración importante para inhibir el crecimiento bacteriano y en consecuencia no se observan los típicos halos de inhibición que son indicadores de la inhibición del crecimiento bacteriano por acción de las actividades antimicrobianas.

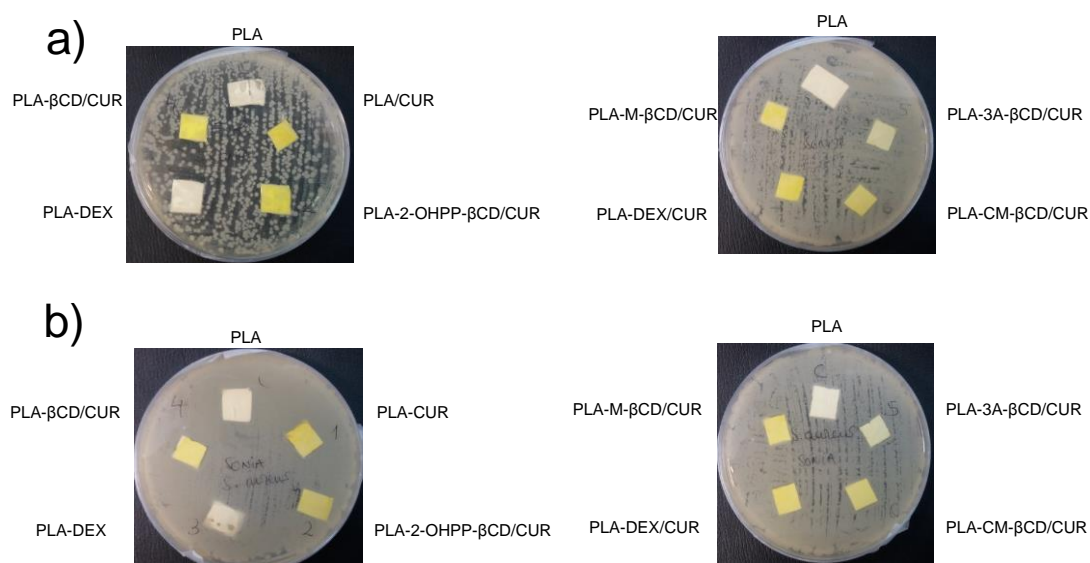


Figura 32. Actividad antimicrobiana de la curcumina cargada en las fibras de PLA como complejos ciclodextrina/curcumina. Test de inhibición del crecimiento bacteriano en a) *E.coli* (Gram-negativa), y b) *S.aureus* (Gram-positiva).

5.5.3. Biocompatibilidad celular

La biocompatibilidad de las matrices de microfibras de PLA cargadas con la curcumina ha sido evaluada usando un test de citotoxicidad a las 24 horas. El ensayo consiste en el cultivo de líneas celulares con características adherentes en presencia de las matrices de PLA cargadas con los complejos ciclodextrina/curcumina. Después de 24 horas de cultivo se evalúa la actividad mitocondrial de las células como indicadora de viabilidad celular, para ello se aplica el reactivo MTT, 3 horas antes de la evaluación. Los resultados obtenidos de este ensayo se muestran en la *Figura 33*

Se han cultivado diferentes líneas celulares: COS-1 (de tipo fibroblasto immortalizado), MCF-7 (línea de carcinoma mamario humano, células de tipo epitelial), MRC-5 (línea de carcinoma pulmonar humano, células de tipo fibroblasto), PC-3 (línea de cáncer de próstata humana, células de tipo fibroblasto), PNT2 (línea immortalizada de próstata humana, células de tipo fibroblasto usada frecuentemente con control y asume normalidad) y células VERO (de tipo epitelial immortalizadas). En la *Figura 33* se muestran los resultados obtenidos para algunas de estas líneas celulares. Con las células MCF-7 y MRC-5, a las 24 horas de cultivo se observó una ligera inhibición del crecimiento en los complejos formados por la dextrina lineal y la curcumina, Lo mismo fue observado solo con el complejo triacetil- β CD/curcumina en las células MCF-7.

Estos resultados serían acorde a la cinética de liberación de la curcumina, y se requieren cultivos por tiempo prolongado para observar los efectos citotóxicos de la curcumina. En todo caso, estos resultados de cultivos durante 24 horas confirman que la liberación de la curcumina desde sus complejos requiere tiempos prolongados de liberación. En la actualidad las matrices de fibras obtenidas por electrospinning son claros dispositivos utilizados para promover el crecimiento de células.

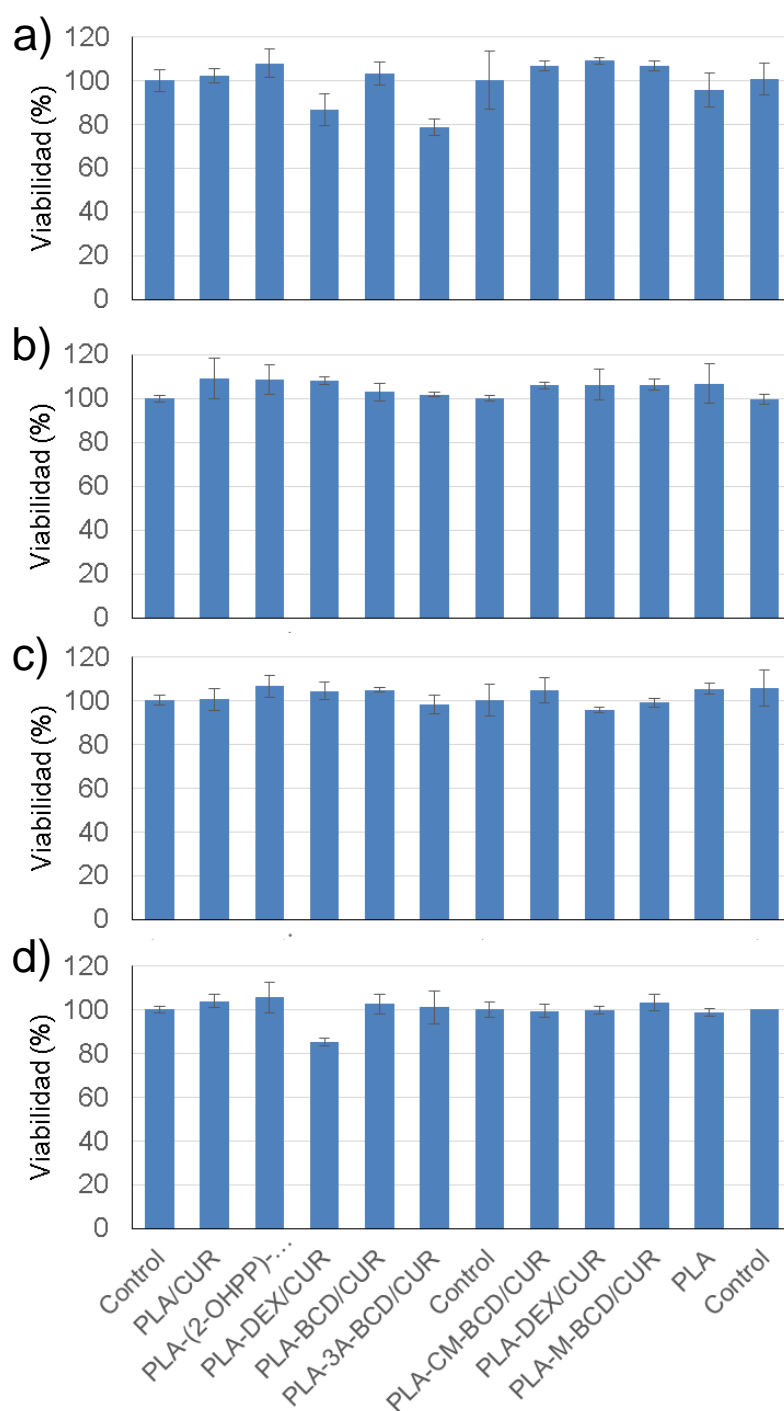


Figura 33. Ensayo de biocompatibilidad. Las células fueron cultivadas durante 24 h en presencia de las matrices cargadas con los complejos ciclodextrina/curcumina. a)MCF-7, b) COS-1, c) VERO y d)MRC-5.

6. Conclusiones

En este PFC se ha procedido a estudiar las microfibras de PLA cargadas con complejos β -ciclodextrina/curcumina. Las conclusiones que ha derivado el estudio son:

- [1] La formación de complejos entre la β -ciclodextrina y la droga antitumoral curcumina son factibles de ser formados por precipitación. La zona no-polar de la β CD sería el lugar preferentemente ocupado por la curcumina. Los sustitutos de la β CD, tales como el 2-hidroxipropil- β CD, triacetil- β CD, carboximetil- β CD, y metil- β CD también pueden formar complejos. Además, se ha demostrado que la dextrina lineal también los puede formar.
- [2] El análisis del potencial-Z ha demostrado que la formación de los complejos es vía interacción electrostática, y la curcumina puede ser alojada en la parte no-polar de la ciclodextrinas.
- [3] La caracterización de los complejos formados puede ser realizada de acuerdo a su tamaño (e.g., diámetro hidrostático) y carga, además de la cinética de liberación. El análisis de ^1H -RMN no ha permitido establecer la relación molar entre los componentes de los complejos, debido a la superposición de las señales del protón de la curcumina y de la ciclodextrinas.
- [4] Los complejos pueden ser encapsulados en fibras de polímeros (e.g., PLA), y la cinética de liberación de la droga puede ser estudiada. Para la curcumina se ha demostrado que la liberación es lenta y en condiciones fisiológicas puede requerir cerca de una semana.
- [5] La ausencia de liberación en tiempo cortos (e.g., 24 horas) fue demostrada por los ensayos de actividad antibacteriana y ensayos de actividad antitumoral via citotoxicidad.

7. Estudio de sostenibilidad del proyecto

7.1. Impacto ambiental

En este apartado se analiza el impacto ambiental y sobre la salud que pueden ocasionar los productos con los que se trabaja en este PFC. De esta manera se puede conocer la mejor forma para tratarlos y disminuir el impacto que pueden causar estos.

Para evaluar este impacto se utiliza el sistema REACH, el Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento y Consejo Europeo creado por la Unión Europea (UE) que se aprobó el 18 de diciembre de 2006, que actualiza la legislación europea en materia sustancias y mezclas químicas ya que es un sistema integrado de registro, evaluación y restricción de éstas.

El Reglamento mencionado anteriormente queda modificado por el Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento y Consejo Europeo, aprobado el 16 de diciembre de 2008 que trata la clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas que ofreciendo un conjunto de criterios armonizados sobre la peligrosidad de las sustancias a nivel de protección de salud humana y medioambiente. La Directiva 67/548/CEE del consejo de 27 de junio de 1967 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas y la Directiva 1999/45/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de mayo de 1999 sobre la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros relativas a la clasificación, el envasado y el etiquetado de preparados peligrosos, se modificará y derogará por el Reglamento descrito.

El Reglamento (CE) nº 1272/2008 queda modificado por el Reglamento (UE) nº 286/2011 de la Comisión de 10 de marzo de 2011, con lo que respecta a la clasificación, etiquetado y envasado para sustancias y mezclas. No obstante, el reglamento no se aplica a sustancias y mezclas etiquetadas antes del 1 de diciembre de 2012 y comercializadas y del 1 de diciembre de 2014. Así pues el Reglamento (UE) nº 286/2011 no influirá en la evaluación ambiental.

Para la realización de la evaluación de las sustancias utilizadas en este proyecto se utilizará la normativa mencionada, el Reglamento (CE) nº 1272/2008 y las directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE, de este modo se conocerán los riesgos de la salud y medioambientales que estas conllevan.

Para cumplir con las disposiciones del REACH las empresas deben identificar y gestionar los riesgos asociados a las sustancias que fabrican y comercializan en la Unión Europea. Deben demostrar cómo usar dichas sustancias de manera segura y comunicar toda aquella información relativa a las medidas de gestión de riesgos a las partes implicadas.

De acuerdo con este reglamento actual, a continuación, se presentan en la *Tabla 4* las sustancias utilizadas que son clasificadas como peligrosas y sus pictogramas y en la *Tabla 5* sus indicaciones (*Hazard Statements*) según el código establecido.

Tabla 3. Clasificación de las sustancias peligrosas utilizadas en el proyecto







Sustancia química	Clase de peligro	Pictogramas
Acetona	H225, H319, H336, EUH066	 
Cloroformo	H302 + H332, H315, H319, H336, H351, H361d, H373	 
Etanol	H225	
MTT	H315, H319, H335	

Tabla 4. Significado de los Hazard Statements de las sustancias de la Tabla 4

Hazard Statements	Significado
EUH066	La exposición repetida puede provocar sequedad o formación de grietas en la piel
H225	Es un líquido inflamable
H302	Es nocivo en caso de ingestión
H315	Provoca irritación cutánea
H319	Provoca irritación ocular grave
H332	Es nocivo en caso de inhalación
H335	Puede causar irritación respiratoria
H336	Puede provocar vértigo o somnolencia
H351	Se sospecha que provoca cáncer
H361d	Se sospecha que daña al feto
H373	La exposición prolongada o repetida puede provocar daños en los órganos

Finalmente, se incluye como se ha realizado el tratamiento de los residuos generados en el laboratorio durante la realización de este PFC.

Los residuos de PLA se han depositado en un recipiente para polímeros sólidos y las mezclas de disolventes (CHCl_3 , acetona y EtOH) en un recipiente para disolventes clorados dada la presencia del CHCl_3 .

Los residuos generados durante el estudio con bacterias, se han depositado en un contenedor especial destinado a material biopeligroso, tratándolo previamente con lejía al 10% para la eliminación de las bacterias.

La empresa gestora que se encarga de los residuos químicos generados por los laboratorios de la ETSEIB es ECOCAT, empresa que colabora con el Centre per a la Sostenibilitat Territorial (CST).

7.2. Evaluación económica

La viabilidad de un proyecto se decide por diferentes factores. Uno de los principales factores para la toma de esta decisión es la evaluación económica.

Para la evaluación del coste total de la realización del proyecto, los costes se calcularán en cuatro apartados diferenciados:

1. El coste de productos químicos y disolventes necesarios para la elaboración de las fibras, los medios de liberación y el resto de métodos de análisis mencionados con anterioridad. Los costes de estos se han obtenido de los catálogos de las empresas suministradoras, Fluka, Sigma Aldrich, etc. Estos costes se recogen en la *Tabla 10*.

Tabla 5. Coste de productos químicos y disolventes

Coste de disolventes y productos químicos			
Disolventes (D)	Precio	Cantidad	Total (€)
Acetona	8,5€/L	0,5 L	4,25
Cloroformo	75€/L	1 L	75
EtOH	20€/L	1 L	20
Productos químicos (PQ)	Precio	Cantidad	Total (€)
(2-OHPP)-BCD	106€/5g	5g	106
3A-BCD	60€/10g	10g	60
Azida de sodio	33,50€/25g	25g	33,50
BCD	78€/5g	5g	78
CM-BCD	90,60€/g	1g	90,60
Curcumina	46,30€/10g	10g	46,30
Dextrina	38,80€/Kg	1Kg	38,80
M-BCD	45,70€/5g	5g	45,70
PBS	75,60€/Kg	1Kg	75,60
PLA	7,5€/100g	20g	1,5
Otros (+10% de PQ)			57,6
TOTAL			732,85

2. El coste personal para la elaboración del proyecto. Se tienen en cuenta las horas de dedicación a las diferentes actividades tal y como se representa en la *Tabla 11*.

Tabla 6. Coste de actividad y personal

Coste personal			
Actividad	Cantidad	Coste (€/h)	Total (€)
Estudio previo y documentación	120	10	1200
Experimentación	720	15	10800
Análisis de resultados	360	20	7200
TOTAL			19200

3. El coste de los equipos (*Tabla 12*) teniendo en cuenta el número de usuarios que lo comparten, la duración del proyecto (8 meses) y la amortización de los equipos.

Tabla 7. Coste de equipos

Coste de equipos				
Aparato	Precio (€)	Amortización (años)	Usuarios	Total (€)
Electrospinning	20000	4	5	875
MO	12000	15	7	96
Cámara digital MO	5400	5	7	128,73
SEM	210000	20	10	878,68
Equipo FTIR	24000	10	7	288
Lector ELISA	3440	5	9	69,55
RMN	240000	22	9	1014,75
UV-Vis	16500	10	10	137,80
TOTAL				3488,51

4. Otros costes como suministros de agua, luz, climatización, etc. se han calculado estimando que equivalen a un 10% del subtotal (*Tabla 13*). Y otros costes como el coste operacional del laboratorio (*overhead*) y posibles imprevistos se han considerado un 21% del subtotal. En la *Tabla 13* se presentan estos costes adicionales junto a los calculados previamente para dar el presupuesto final.

Tabla 8. Coste total del proyecto

Coste total	
Concepto	Total (€)
Coste productos	732,85
Coste personal	19200
Coste equipos	3488,51
Subtotal	23421,36
Gastos generales (10% subtotal)	2342,14
Coste operacional (21% subtotal, <i>Overhead</i>)	4918,49
TOTAL	54103,35

Agradecimientos

En primer lugar agradecer a mi tutor Dr. Luis Javier del Valle la gran implicación, dedicación, comprensión y mucha paciencia recibida durante estos meses. También por los conocimientos de técnicas y conceptos transmitidos para la realización de este proyecto.

También quisiera agradecer al Dr. Jordi Puiggalí, por darme la oportunidad de realizar mi PFC en el grupo de investigación de PSEP y por su interés mostrado durante la evolución del proyecto. Agradecer también a todos los compañeros y miembros del Grupo de Investigación en Polímeros Sintéticos, Estructura y Propiedades (PSEP) del Departamento de Ingeniería Química de la Universitat Politècnica de Catalunya.

Por otro lado, agradecer a mi amiga Mireia Campillo por la compañía en el laboratorio y por su apoyo moral tanto dentro como fuera de éste.

Quisiera agradecer a mis amigos Cristian y Robert por la agradable compañía durante muchas de las horas tras la pantalla del ordenador y por sus ánimos y buenos consejos.

Por último, dar las gracias a toda mi familia por haber sido un gran apoyo, por los ánimos, comprensión y cariño que me han dado durante todos estos años. Sin ellos este proyecto no hubiera sido posible.

Bibliografía

Referencias bibliográficas

- [1] PUIGGALÍ J. Estructura y propiedades de los polímeros. CPDA, ETSEIB: 2009.
- [2] LÓPEZ CARRASQUERO, F. *Fundamentos de polímeros*, Venezuela: Universidad de los Andes, 2004.
- [3] INDUSTRY COUNCIL. Biodegradable Polymers: a Review. Technical Report. ASTM. 2000, p. 6-7.
- [4] MORIANA, R. Desarrollo y caracterización de biocomposites enfibrados procedentes de recursos renovables. Estudio de su degradación en tierra. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia. Octubre 2010.
- [5] ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES DE VALLADOLID. *Los polímeros en medicina*. Valladolid, 2006. [http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/sitios_relacionados.htm, 13 de Noviembre de 2015].
- [6] Bellon-Maruel, V., CALMON-DECRIAUD, A., IVESTRE, F. Standard methods for testing aerobic biodegradation of polymeric review and perspectives. *Advances in polymer science*. Vol. 135. Berlín, Springer-Verlag, 1988.
- [7] KALPAKJIAN S., SCHMID STEVEN R. *Manufactura, ingeniería y tecnología*. Pearson Educación de México, S.A.: 2002, cap.7,p. 195-197.
- [8] VALERA O., UHRIG M.L. *Química sustentable*. Ediciones UNL: 2004, cap.5, p.104-106.
- [9] ARADILLA ZAPATA D., OLIVER PUJOL R., ESTRANY CODA F., *Polímeros biodegradables: una alternativa de futuro a la sostenibilidad del medio ambiente*. Técnica Industrial. 2012, Vol. 297, p. 76-80.
- [10] SERNA, L., RODRIGUEZ, A., ALBÁN, F. *Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones*. Ingeniería y Competitividad, 2003.

- [11] REN, J. *Biodegradable Poly(Lactic Acid). Synthesis, modification, processing and applications*. Shangai, Springer 2010.
- [12] CHEN Y., LIN J., WAN Y., FEI Y., WANG H.,GAO W. Preparation and Blood Compatibility of Electrospun PLA/Curcumin Composite Membranes. *Fibers and Polymers*. 2012, Vol. 13 nº10, p. 1254-1258.
- [13] THANGARAJU E., SRINIVASAN T.N., KUMAR R., SEHGAL K.P., RAJIV S. Fabrication of Electrospun Poly L-lactide and Curcumin Loaded Poly L-lactide Nanofibers for Drug Delivery. *Fibers and Polymers*. 2012, Vol. 13 nº7, p. 823-830.
- [14] SUWANTOG O., OPANASOPIT P., RUKTANONCHAI U., SUPAPHOL P. Electrospun cellulose acetate fiber mats containing curcumin and release characteristic of the herbal substance. *Polymer*. 2007, Vol.48, p. 7546-7557.
- [15] SUN X-Z., WILLIAMS R.G., HOU X-X., ZHU L-M. Electrospun curcumin-loaded fibers with potential biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*. 2013, Vol. 94, p. 147-153.
- [16] KATAGERI, A.R., SHEIKH, M.A. Cyclodextrin a gift to pharmaceutical world review. *International Research Journal of Pharmacy*. 3 p. 52-56 (2012).
- [17] SHEWALE, B.D., SAPAKAL, N.P., RAUT, N.A., *et al.* Effect of hydroxypropyl-.beta.-cyclodextrin on solubility of carvedilol. *Indian J Pharm Sci* 70. 255-257 (2008).
- [18] LOFTSSON, T., JANSOOK, P., STEFÁNSSON, E. Topical drug delivery to the eye: Dorzolamide. *Acta Ophthalmol* p. 603-608 (2012).
- [19] RAO, V.M., NERURKAR, M., PINNAMANENI, S., *et al.* Co-solubilization of poorly soluble drugs by micellization and complexation. *Int J Pharm* 319 p. 98-106 (2006).
- [20] LOPEZ, M., RODRIGUEZ, L., DUQUE SENCHEZ, M. *Electrospinning: la era de las nanofibras*. [<http://www.ehu.eus/reviberpol/pdf/ENE13/duque.pdf>, 20 de Noviembre de 2015].
- [21] FORMHALS A. US Patent. 1934, 1,975,504.
- [22] TSERKI V., FILIPPOU I., PANAYIOTOU C. Preparation and Characterization of Electrospun Poly(butylene succinate-co-butylene adipate)

Nanofibrous Nonwoven Mats. Journal of Nanoengineering and Nanosystems. 2006, Vol. 220 n°2, p. 71-79.

- [23] BHARDWAJ N., KUNDU S.C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. Elsevier. Biotechnology Advances. 2010, Vol. 28, p. 325-347.
- [24] SEERAM, R., KAZUTOSHI, F., WEE-EONG, T., TEIK-CHENG, L., ZUWEI, M. *An introduction to electrospinning and nanofibers*, de Electrospinning process, Singapur, World Science, 2005.
- [25] HAN D., STECKL A.J., Superhydrophobic and Oleophobic Fibers by Coaxial Electrospinning. Langmuir. 2009, Vol. 25 n°16, p. 9454-946
- [26] HAYASHI, T. Biodegradable polymers for biomedical applications. Program polymer science. Vol. 19, 1994, p. 663-702.
- [27] BHARDWAJ N., KUNDU S.C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. Elsevier. Biotechnology Advances. 2010, Vol. 28, p. 325-347.
- [28] BURGER C., HSIAO S.B., CHU B., Nanofibrous Materials and Their Applications. Annual Review Materials Research. 2006, Vol. 36, p. 333-368.
- [29] AGARWAL S., WENDORFF H.J., GREINER A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. Polymer. 2008, Vol.49, p. 5603-5621.
- [30] BUCHKO C.J., CHEN L.C., SHEN Y., MARTIN D.C. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. Polymer. 1999, Vol. 40, p. 7397-7407.
- [31] BUCHKO C.J., KOZLOFF K.M., MARTIN D.C. Surface characterization of porous, biocompatible protein polymer thin films. Biomaterials. 2001, Vol. 22, p. 1289-1300.
- [32] ZANG Y., LIM C.T., RAMAKRISHNA S., HUANG Z.M. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. Materials in Medicine. 2005, Vol. 16, p. 933-946.
- [33] AGRAWAL C.M., RAY R.B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. Journal of Biomedical Materials Research. 2001, Vol.55 n°2, p.141150.
- [34] BUSCHLE-DILLER G., COOPER J., XIE Z., WU Y., WALDRUP J., REN X. Release of antibiotics from electrospun bicomponent fibers. Cellulose. 2007, Vol.14 n°16, p. 553-562.

- [35] YU D.G., WANG X., LI X.Y., CHIAN W., LI Y., LIAO Y.Z., Electrospun biphasic drug release polyvinylpyrrolidone/ethyl cellulose core/sheath nanofibers. *Acta Biomaterialia*. 2013, Vol. 9, p. 5665-5672.

- [36] TECHNICAL STAFF OF MATERIALS EVALUATION AND ENGINEERING. *Handbook of Analytical Methods For Materials*. United States 2010.

- [37] WAKANA S., NAGAI T., SAKATA Y. Wide bandwidth scanning Kerr microscope based on optical sampling technique using externally triggerable pulse laser diode. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2001, Vol. 235, p. 213-217.

- [38] WOODWARD R. Contact angle measurements using the drop shape method. Porstmouth: physics department of oregon's college of engineer. 1999.

- [39] KACURÁKOVÁ M., WILSON H.R. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers*. 2001, Vol. 44, p. 291-303.

- [40] BERNE, B.J.; PECORA, R. *Dynamic Light Scattering*. Courier Dover Publications (2000).

- [41] CHU, B. *Laser Light scattering: Basic Principles and Practice*. Academic Press (1992).

- [42] *Instruction Manual for the NanoBrook Series Particle/Protein Size and Zeta Potential Analyzer* January, 2014 Catalog Number : NanoBrook, Ver. 1.0.

- [43] O'BRIEN, RICHARD W.; WHITE, LEE R. *Electrophoretic mobility of spherical colloidal particle*. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2* 74: 1607 (1978).

- [44] KASAAI R.M. Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2010, Vol. 79, p. 801-810.

Bibliografía complementaria

FERRAN R. Preparación de andamios temporales con distinta hidrofobicidad y respuesta antibacteriana. Proyecto final de carrera, Universidad Politécnica de Cataluña (ETSEIB). Octubre 2012.

KHON, J., PACHENCE, J. *Principles of tissue engineering*. New York, Academic Press, 1997, p. 273

MARTÍNEZ, P., MARÍN, P. *Diseño y estudio de una máquina de Electrospinning*. Proyecto Final de Carrera. 2009

PUIGGALÍ, J. *Estructura y propiedades de los polímeros. Física de Polímeros*. Apuntes de Máster de polímeros. Barcelona, ETSEIB, 2014

SERNA, L., RODRÍGUEZ, A., ALBÁN, F. *Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones*. Ingeniería y Competitividad, 2003, p. 16-26

SILVIA. *Andamios temporales basados en mezclas de poliláctico-polibiguanida: material con actividad antibacteriana*. Proyecto Final de Carrera. 2012

STEVEN, B., LAWRENCE, H. *Tissue Engineering: Roles, Materials and Applications*. New York: Nova Science Publishers, 2008.

TIPTON, A., MIDDLETON, J. *Biomaterials*, 2000, p. 23-35.